



| | | | |
|---|--|--|--|
| (51) Internationale Patentklassifikation 6 : C12N 15/54, 9/10, 1/21, C12P 13/12 | | A1 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/15673 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 1. Mai 1997 (01.05.97) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/04613 (22) Internationales Anmeldedatum: 24. Oktober 1996 (24.10.96) (30) Prioritätsdaten: 195 39 952.8 26. Oktober 1995 (26.10.95) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): CONSORTIUM FÜR ELEKTROCHEMISCHE INDUSTRIE GMBH [DE/DE]; Zielstattstrasse 20, D-81379 München (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LEINFELDER, Walfred [DE/DE]; Bodenschneidstrasse 5, D-81549 München (DE). HEINRICH, Peter [DE/DE]; Kapellenstrasse 11, D-86447 Todtenweis (DE). (74) Anwälte: POTTEN, Holger usw.; Wacker-Chemie GmbH, Zentralabteilung PML, Hanns-Seidel-Platz 4, D-81737 München (DE). | | (81) Bestimmungsstaaten: BR, CA, CN, CZ, HU, JP, KR, MX, PL, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i> | |
| (54) Title: PROCESS FOR PREPARING O-ACETYL SERINE, L-CYSTEINE AND L-CYSTEINE-RELATED PRODUCTS (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON O-ACETYL SERIN, L-CYSTEIN UND L-CYSTEIN-VERWANDTEN PRODUKTEN (57) Abstract <p>The invention concerns processes for preparing O-acetylserine, L-cysteine and sulphurous compounds derived therefrom using feedback-resistant serine acetyl transferases. In comparison with the wild-type enzyme, these serine acetyl transferases have reduced sensitivity to the inhibitor L-cysteine and a protein sequence which, in comparison with the wild-type enzyme, displays at least one mutation or deletion. The processes are characterized in that the mutation lies in the sequence region of the amino acid in position 97 up to and including the amino acid in position 273 or the deletion lies in the carboxy terminal sequence region as from the amino acid in position 227, position 1 being the starter methionine of figure (5) (SEQ ID NO: 1) and the mutation from Met to Ile in position 256 being excluded.</p> | | | |
| (57) Zusammenfassung <p>Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung von O-Acetylserin, L-Cystein, und davon abgeleiteten schwefelhaltigen Verbindungen unter Verwendung feedbackresistenter Serin-Acetyltransferasen. Diese Serin-Acetyltransferasen haben eine im Vergleich zum Wildtyp-Enzym reduzierte Sensitivität gegenüber dem Inhibitor L-Cystein und eine Proteinsequenz, die im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz mindestens eine Mutation oder Deletion aufweist, dadurch gekennzeichnet, daß die Mutation im Sequenzbereich von Aminosäure in Position 97 bis einschließlich der Aminosäure in Position 273 liegt oder die Deletion im carboxyterminalen Sequenzbereich ab der Aminosäure in Position 227 liegt, wobei Position 1 das Startmethionin aus Fig. 5 (SEQ ID NO: 1) ist und wobei die Mutation von Met zu Ile in Position 256 ausgeschlossen ist.</p> | | | |

$$\begin{array}{r} 42 \\ 42 \\ \hline 84 \end{array}$$

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | |
|----|--------------------------------|----|-----------------------------------|----|--------------------------------|
| AM | Armenien | GB | Vereinigtes Königreich | MX | Mexiko |
| AT | Österreich | GE | Georgien | NE | Niger |
| AU | Australien | GN | Guinea | NL | Niederlande |
| BB | Barbados | GR | Griechenland | NO | Norwegen |
| BE | Belgien | HU | Ungarn | NZ | Neuseeland |
| BF | Burkina Faso | IE | Irland | PL | Polen |
| BG | Bulgarien | IT | Italien | PT | Portugal |
| BJ | Benin | JP | Japan | RO | Rumänien |
| BR | Brasilien | KE | Kenya | RU | Russische Föderation |
| BY | Belarus | KG | Kirgisistan | SD | Sudan |
| CA | Kanada | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | SE | Schweden |
| CF | Zentrale Afrikanische Republik | KR | Republik Korea | SG | Singapur |
| CG | Kongo | KZ | Kasachstan | SI | Slowenien |
| CH | Schweiz | LI | Liechtenstein | SK | Slowakei |
| CI | Côte d'Ivoire | LK | Sri Lanka | SN | Senegal |
| CM | Kamerun | LR | Liberia | SZ | Swasiland |
| CN | China | LK | Litauen | TD | Tschad |
| CS | Tschechoslowakei | LU | Luxemburg | TG | Togo |
| CZ | Tschechische Republik | LV | Lettland | TJ | Tadschikistan |
| DE | Deutschland | MC | Monaco | TT | Trinidad und Tobago |
| DK | Dänemark | MD | Republik Moldau | UA | Ukraine |
| EE | Estland | MG | Madagaskar | UG | Uganda |
| ES | Spanien | ML | Mali | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| FI | Finnland | MN | Mongolei | UZ | Usbekistan |
| FR | Frankreich | MR | Mauretanien | VN | Vietnam |
| GA | Gabon | MW | Malawi | | |

Verfahren zur Herstellung von O-Acetylserin, L-Cystein und L-Cystein-verwandten Produkten

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung von O-Acetylserin, L-Cystein und davon abgeleiteten schwefelhaltigen Verbindungen.

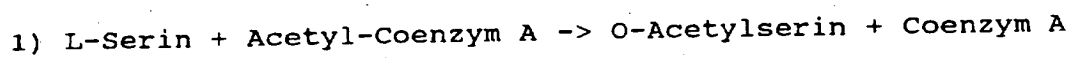
L-Cystein und seine Derivate werden im Pharmabereich (Behandlung von Bronchialkrankheiten), Kosmetiksektor (als Bestandteil in Haarshampoos und Dauerwellenlotionen) und im Lebensmittelbereich (als Antioxidans, Geschmacksverstärker und als Adjuvans bei der Bearbeitung des Teiges) eingesetzt. L-Cystein wird bisher durch Extraktion aus keratinhaltigem Material wie Haaren, Borsten, Hörnern, Hufen und Federn oder durch enzymatische Umsetzung von Vorstufen gewonnen. Eine Überproduktion von L-Cystein durch Mikroorganismen ist sehr wünschenswert, da nicht nur L-Cystein eine wirtschaftlich interessante Verbindung ist, sondern da es zusätzlich, wie aus den Fig. 1-3 hervorgeht, eine wichtige Zwischenverbindung für die Synthese von Glutathion, Methionin und Biotin darstellt.

L-Cystein nimmt in allen Organismen eine Schlüsselposition im Schwefelmetabolismus ein und wird in der Synthese von Proteinen, Glutathion, Biotin, Methionin und anderen, schwefelhaltigen Metaboliten verwendet. Zudem dient L-Cystein als Vorläufer für die Biosynthese von Coenzym A,

- 2 -

darüberhinaus kann L-Cystein leicht zu Cystin oxidiert werden. Zwischen der Biosynthese von L-Cystein und anderen Aminosäuren wie L-Serin, Glycin und L-Methionin besteht eine enge Verbindung.

Die Synthese von L-Cystein (Fig. 4) ist in Prokaryonten, insbesondere Bakterien, ausführlich untersucht (Kredich, N. M. and G. M. Tomkins 1966, J. Biol. Chem. 241: 4955 - 4965; Kredich, N. M., 1987, Biosynthesis of Cysteine. In: Neidhardt F. C., Ingraham, J. L., Magasanik, B., Low, K. B., Schaechter, M., Umberger, H. E. (eds) Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology, Vol. 1. American society for Microbiology, Washington D. C., 419 - 428). Die Schlüsselreaktion besteht in der Übertragung einer Acetylgruppe auf das Serin zur Erzeugung von O-Acetylserin 1), gefolgt von dem Austausch der Acetylgruppe gegen die SH-Gruppe, wodurch L-Cystein synthetisiert wird 2).



In Mikroorganismen und in Pflanzen dient O-Acetylserin und nicht Serin als unmittelbarer Vorläufer des Kohlenstoffgerüsts für L-Cystein (Kredich, N. M. and G. M. Tomkins 1966, J. Biol. Chem. 241: 4955 - 4965). Die Reaktion der Acetylgruppenübertragung zur Bildung einer aktivierten Form von L-Serin wird durch die vom cysE-Gen kodierte Serin-Acetyltransferase (EC 2.3.1.30) katalysiert und unterliegt einer strikten Kontrolle durch das Endprodukt L-Cystein. Das Gen für die Serin-Acetyltransferase wurde bereits kloniert und die von der DNS-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz ist bekannt (Denk, D. and Böck, A. 1987, J. Gen. Microbiol. 133: 515 - 525.).

- 3 -

Die Bildung von L-Cystein selbst wird katalysiert von zwei O-Acetylserin Sulfhydrylase Isoenzymen (EC 4.2.99.8), kodiert von den Genen *cysK* (O-Acetylserin-Sulfhydrylase-A) und *cysM* (O-Acetylserin-Sulfhydrylase-B), eine Reaktion, in welcher O-Acetylserin als β -Alanyl-Donor und H_2S als β -Alanyl-Akzeptor fungiert (Kredich, N. M. and G. M. Tomkins 1966, J. Biol. Chem. 241: 4955 - 4965), wobei die O-Acetylserin-Sulfhydrylase-A den Hauptanteil an der Cystein-Synthese hat. Zusätzlich ist die O-Acetylserin-Sulfhydrylase-B (*cysM*) in der Lage, Thiosulfat als Schwefelquelle zu verwerten (Sirko, A. et al., 1987, J. Gen. Microbiol. 133: 2719-2725). Die O-Acetylserin-Sulfhydrylase-B katalysiert die Reaktion zwischen O-Acetylserin und Thiosulfat zu S-Sulfocystein, welches dann zu Cystein konvertiert werden kann (Nakamura, T., et al, 1983, J. Bacteriol. 156, 656-662).

Die Endprodukthemmung der Wildtyp-Form der Serin-Acetyltransferase durch L-Cystein ist ein physiologisch bedeutender Faktor in der kinetischen Regulation der Cystein-Biosynthese (Kredich, N. M. 1971, J. Biol. Chem. 246, 3474 - 3484; Kredich, N. M. and G. M. Tomkins 1966, J. Biol. Chem. 241, 4955 - 4965). Die Aktivität der Wildtyp-Form der Serin-Acetyltransferase wird durch Cystein gehemmt. Diese Hemmung wurde kinetisch untersucht und zeigte eine kompetitive Charakteristik. Es wurde eine Inhibitorkonstante $K_i = 1,1 \times 10^{-6}$ M in Gegenwart von 0.1 mM Acetyl-Coenzym A und 1 mM L-Serin bestimmt (Kredich, N. M. 1971 and Tomkins G.M. 1966, J. Biol. Chem. 241, 4955 - 4965).

Es ist ein Beispiel aus der Literatur bekannt, daß durch chemische Mutagenese eines Cystein-auxotrophen Stammes mit Methansulfonsäureethylester eine Cystein-prototrophe Rever-

- 4 -

tante isoliert werden kann, deren Serin-Acetyltransferase-Aktivität aufgrund eines Aminosäureaustausches im kodierenden Bereich eine schwach ausgeprägte Endprodukt-Hemmung durch L-Cystein aufweist (Denk, D., Böck, A., 1987, J. Gen. Microbiol. 133: 515 - 525). Die Feedbackresistenz dieser Mutante ist laut der genannten Literaturstelle 10 fach erhöht. Der K_i dieser Mutante liegt somit bei ca. 0,01 mM gegenüber der Wildtypform.

Die vorliegende Erfindung betrifft Serin-Acetyltransferasen die eine im Vergleich zum Wildtyp-Enzym reduzierte Sensitivität gegenüber dem Inhibitor L-Cystein aufweisen und deren Proteinsequenz im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz mindestens eine Mutation oder Deletion aufweist, dadurch gekennzeichnet daß die Mutation im Sequenzbereich von Aminosäure in Position 97 bis einschließlich der Aminosäure in Position 273 liegt oder die Deletion im carboxyterminalen Sequenzbereich ab der Aminosäure in Position 227 liegt, wobei Position 1 das Startmethionin aus Fig. 5 (SEQ ID NO: 1) ist und wobei die Proteinsequenz mit der Mutation von Met zu Ile in Position 256 ausgeschlossen ist.

Überraschend wurde gefunden, daß die erfindungsgemäßen Aminosäureaustausche und/oder Aminosäure-Deletionen des Carboxyterminus der Serin-Acetyltransferase zu einer Herabsetzung der Cystein-Sensitivität unter Beibehaltung einer ausreichenden, enzymatischen Aktivität führen.

Die erfindungsgemäßen Serin-Acetyltransferasen haben vorzugsweise eine Inhibitorkonstante K_i von 0,005 bis 2,3 mM in Gegenwart von 1 mM L-Serin und 0,1 mM Acetyl-CoA, wobei Serin-Acetyltransferasen mit mindestens einer Mutation vorzugsweise eine Inhibitorkonstante K_i von 0,015 bis 2,3 mM in Gegenwart von 1 mM L-Serin und 0,1 mM Acetyl-CoA besitzen, während Serin-Acetyltransferasen mit mindestens

- 5 -

einer carboxyterminalen Deletion vorzugsweise eine Inhibitorkonstante K_i von 0,005 bis 0,03 mM in Gegenwart von 1 mM L-Serin und 0,1 mM Acetyl-CoA aufweisen.

Die Inhibitor-Konstanten (K_i) der besonders bevorzugten Enzymmutanten gegenüber L-Cystein liegen zwischen 0,02 und 2,3 mM in Gegenwart von 1 mM L-Serin und 0,1 mM Acetyl-CoA.

Erfindungsgemäße Serin-Acetyltransferasen, weisen eine für das Wachstum der sie beinhaltenden Mikroorganismen ausreichende Aktivität auf.

Vorzugsweise umfaßt die Proteinsequenz einer erfindungsgemäßen Serin-Acetyltransferase die Aminosäureaustausche mindestens einer der in Tab. 1a oder 1b genannten *cysE* Mutanten.

Tab. 1a: Feedbackresistente *cysE*-Allele mit singulären oder multiplen Aminosäureveränderungen im kodierenden Bereich

Tab. 1a

| cysE-Mutante | Nukleotid-Aus- tausch (Nr.) | Aminosäure- Austausch (Nr.) | K _i (μM) | spez. Akt μmol/min x mg |
|--------------|--|--|---------------------|----------------------------|
| cysEII | GGC->AGC (934) | Gly238->Ser238 | 10 | 0,068 |
| cysEIII | GGT->GAT (716) | Gly165->Asp165 | 10 | 0,030 |
| cysEIV | GCT->GTT (932) GGC->AGC (934) | Ala237->Val237 Gly238->Ser238 | 40 | 0,170 |
| cysEV | GCT->GTT (932) GGC->AGC (934) ATG->ATA (990) | Ala237->Val237 Gly238->Ser238 Met256->Ile256 | 10 | 0,246 |
| cysEVI | GGC->AGC (934) ATG->ATA (990) | Gly238->Ser238 Met256->Ile256 | 10 | 0,075 |

- 7 -

| cysE-Mutante | Nukleotid-Aus- tausch (Nr.) | Aminosäure- Austausch (Nr.) | K _i (μM) | spez. Akt μmol/min x mg |
|--------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------|----------------------------|
| CYSEVII | GCT->GTT (932) | Ala237->Val237 | 10 | 0,253 |
| CYSEVIII | ATG->ATA (990) | Met256->Ile256 | 30 | 0,160 |
| | GCT->GTT (932) | Ala237->Val237 | | |
| CYSEX | ACG->GCG (721) | Thr167->Ala167 | 50 | 0,156 |
| CYSEXI | ACG->GCG (721) | Thr167->Ala167 | 700 | 0,117 |
| | GGT->AGT (955) | Gly245->Ser245 | | |
| CYSEXII | AAA->CAA (511) | Lys97->Gln97 | 40 | 0,254 |
| | GGC->AGC (934) | Gly238->Ser238 | | |
| | TTT->TTG (1023) | Phe267->Leu267 | | |
| CYSEXIII | GTT->GCT (713) | Val164->Ala164 | 30 | 0,213 |
| | TTT->TTG (1023) | Phe267->Leu267 | | |

| cysE-Mutante | Nukleotid-Aus- tausch (Nr.) | Aminosäure- Austausch (Nr.) | K _i (μM) | spez. Akt μmol/min x mg |
|--------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------|----------------------------|
| cysEXIV | ACG->GCG (721) | Thr167->Ala167 | >1000 | 0,453 |
| | ATG->TAG(988+989) | Met256->Stop256 | | |
| cysEXVI | GAT->GGT (971) | Asp250->Gly250 | 50 | 0,554 |
| | AAG->TAG (973) | Lys251->Stop251 | | |
| cysEXVII | GGT->GAT (716) | Gly165->Asp165 | 100 | 0,052 |
| | ACG->GCG (721) | Thr167->Ala167 | | |
| cysEXXIII | ACG->GCG | Thr167->Ala167 | 2300 | 0,085 |
| | GCT->GTT | Ala237->Val237 | | |
| | GGC->AGC | Gly238->Ser238 | | |

- 9 -

Tab. 1b: Feedbackresistente cysE-Allele mit carboxyterminalen Deletionen

| cysE-Mutante | Deletierte Aminosäuren | Terminale Aminosäure | K _i (μM) | spez. Akt. μmol/min x mg |
|--------------|------------------------|----------------------|---------------------|--------------------------|
| cysE-Del259 | 14 | His259 | 7.5 | 0,328 |
| cysE-Del258 | 15 | Gln258 | 5 | 0,256 |
| cysE-Del257 | 16 | Asp257 | 7.5 | 0,394 |
| cysE-Del256 | 17 | Met256 | 12.5 | 0,366 |
| cysE-Del255 | 18 | Asp255 | 30 | 0,624 |
| cysE-Del250 | 23 | Asp250 | 20 | 0,405 |
| cysE-Del249 | 24 | Ser249 | 15 | 0,420 |
| cysE-Del248 | 25 | Asp248 | 12.5 | 0,270 |

Erfindungsgemäße Cystein-insensitive Serin-Acetyltransferasen können beispielsweise durch Expression von DNS-Sequenzen, welche für erfindungsgemäße Serin-Acetyltransferasen kodieren, erhalten werden.

Die durch diese DNS-Sequenzen kodierten Enzymvarianten weisen jeweils unterschiedliche Sensitivität gegenüber dem Inhibitor L-Cystein auf, wobei in allen Fällen jedoch zumindest eine im Vergleich zum Wildtyp fünffach erhöhte Resistenz der Serin-Acetyltransferase gegenüber dem Inhibitor L-Cystein gefunden wurde.

- 10 -

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner DNS-Sequenzen, welche für erfindungsgemäße Serin-Acetyltransferasen kodieren.

Diese DNS-Sequenzen sind dadurch gekennzeichnet, daß sie im kodierenden DNS Sequenzbereich des jeweiligen cysE-Gens von bp 510 bis bp 1040 mindestens eine Mutation aufweisen, wobei bp 1 die ersten Base aus Fig. 6 (SEQ ID NO: 2) ist, wobei die Mutation von Guanin nach Adenin in Position 990 ausgeschlossen ist.

Im folgenden werden die erfindungsgemäßen DNS-Sequenzen auch als feedbackresistente cysE-Allele bezeichnet.

Diese DNS-Sequenzen lassen sich beispielsweise durch unspezifische oder durch gezielte Mutagenesemethoden aus im folgenden beschriebenen Ausgangsmaterial herstellen.

Unspezifische Mutationen innerhalb der genannten DNS-Region können zum Beispiel durch chemische Agentien (z.B. Nitrosoguanidin, Ethylmethansulfonsäure u.ä.) und/oder durch physikalische Methoden (Miller, J.H., 1972, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, USA: 113-185) und/oder durch unter bestimmten Bedingungen durchgeführte PCR-Reaktionen erzeugt werden (Gibbs, R.A. 1990, Anal. Chem. 62: 1202-1214).

Methoden zur Einführung von Mutationen an spezifischen Positionen innerhalb eines DNS-Fragments sind bekannt und beispielsweise in folgenden Veröffentlichungen beschrieben: Sarkar, G., Sommer, S.S., 1990, BioTechniques 8: 404-407, beschreiben ortsspezifische Mutagenese mittels PCR; Ausubel, F.M. et al., 1987, S. 8.01-8.3.6 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, beschreiben Methoden zur ortsspezifische Mutagenese mittels M13 Phagen.

Eine weitere Methode zur Erzeugung feedbackresistenter cysE-Allele besteht in der Kombination verschiedener, zur Feedbackresistenz führender Punktmutationen zu multiplen Mutanten mit neuen Eigenschaften.

Als Ausgangsmaterial für die Mutagenese dient vorzugsweise die DNS des Wildtyp-cysE-Gen oder ein durch Mutation inaktiviertes cysE-Gen oder ein mutiertes und bereits für eine feedbackresistente Serinacetyltransferase kodierendes cysE-Gen.

Das zu mutierende cysE-Gen kann chromosomal oder extrachromosomal kodiert sein.

Das, beispielsweise das Wildtyp-cysE-Gen umfassende, Ausgangs-DNS-Fragment wird mit bekannten Standardtechniken zur Herstellung rekombinanter DNS auf einen Vektor rekombiniert. Durch Anwendung der vorgenannten Mutagenesemethoden werden ein oder mehrere Nukleotide der DNS-Sequenz so verändert, daß die nun durch das Gen kodierte Aminosäuresequenz mindestens eine Mutation im Sequenzbereich von Position 97 bis einschließlich der Aminosäure in Position 273 aufweist oder mindestens eine Deletion im carboxyterminalen Sequenzbereich ab der Aminosäure in Position 227 vorhanden ist, wobei Position 1 das Startmethionin aus Fig. 5 (SEQ ID NO: 1) ist und wobei die Mutation von Met zu Ile in Position 256 ausgeschlossen ist.

Mit den beschriebenen Techniken lassen sich in ein beliebiges cysE-Gen eine oder mehrere Mutationen im genannten DNS-Bereich einführen, die bewirken, daß die kodierte Serin-Acetyltransferase eine zur Cystein-Insensitivität führende Aminosäuresequenz besitzt.

- 12 -

Im Anschluß an die beispielsweise wie beschrieben durchgeführte Mutagenese erfolgt die Selektion der Mutanten mit dem gewünschten Phänotyp beispielsweise durch Plattierung auf Cystein-freies Medium und anschließender Bestimmung des Ausmaßes der Cystein-Sensitivität der mutierten Serin-Acetyltransferase.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Mikroorganismen, welche die feedbackresistente cysE-Allele enthalten.

Solche Stämme von Mikroorganismen sind dadurch gekennzeichnet, daß sie einen zumindest durch ein feedbackresistentes cysE-Allel deregulierten Cysteinstoffwechsel besitzen.

Da bei allen Mikroorganismen der Cysteinstoffwechsel prinzipiell über denselben, an sich bekannten Stoffwechselweg verläuft und die zur Herstellung der erfindungsgemäßen Stämme anzuwendenden Techniken z.B. aus Standardlehrbüchern allgemein bekannt und auf alle Mikroorganismen anwendbar sind, sind erfindungsgemäße Stämme aus beliebigen Mikroorganismen herstellbar.

Bevorzugt geeignet zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Stammes sind Bakterien.

Besonders bevorzugt geeignet sind gram-negative Bakterien, insbesondere E. coli.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Herstellung von L-Cystein oder von L-Cystein abgeleiteten Produkten durch Kultivierung erfindungsgemäßer Mikroorganismen.

Die feedbackresistenten cys-E Allele ermöglichen eine Aufhebung der Kontrolle eines wichtigen, biosynthetischen

Kontrollpunktes, wodurch die Produktion zahlreicher, stromabwärts von diesem Kontrollpunkt liegenden Verbindungen verstärkt wird. Dazu zählen insbesondere O-Acetylserin, L-Cystein und L-Cystein-verwandte Produkte. L-Cystein-verwandte Produkte sind alle von L-Cystein abgeleiteten Produkte, d.h. schwefelhaltige Verbindungen, zu deren Herstellung L-Cystein erforderlich ist. Beispiele für solche Produkte sind 2(R,S)-Methyl-Thiazolidin-2(R,S),4(R)-dicarbonsäure, Homocystein, Methionin, Biotin und Glutathion.

Die feedbackresistenten cys-E Allele werden zur Expression des veränderten Serin-Acetyltransferase-Enzyms mittels üblicher Verfahren in einen Wirtstamm transformiert. Das "Screening" nach Stämmen mit veränderten Serin-Acetyltransferase-Eigenschaften erfolgt beispielsweise mittels der im folgenden beschriebenen Methoden.

Zur Bestimmung des Ausmaßes der Cystein-Insensitivität des veränderten Enzyms wird zunächst in einem semiquantitativen, sog. Kreuzfütterungstest die Cysteinausscheidung der Stämme gemessen. Dazu werden die zu testenden Stämme auf Cystein-freies Minimalmedium, dem ein Cystein-auxotropher Indikatorstamm zugesetzt ist, ausgebracht. Die Wachstumszone des Indikatorstammes um den jeweiligen Impfstrich (Halo) dient als semiquantitatives Maß für die Cysteinausscheidung. Alle Stämme die im Kreuzfütterungstest ein Halo mit einem Radius > 2 mm aufweisen, werden als "positiv im Kreuzfütterungstest" bezeichnet. Mit den selektierten Stämmen wird zur Bestimmung des Ausmaßes der Cysteintoleranz der veränderten Serin-Acetyltransferase ein Enzymaktivitätstest durchgeführt.

Für die Bestimmung der Cystein-Sensitivität der Serin-Acetyltransferase kann jede Methode benutzt werden, die es erlaubt, die Aktivität dieses Enzyms in Anwesenheit von Cystein zu bestimmen. Beispielsweise kann die Bestimmung der

- 14 -

Serin-Acetyltransferase-Aktivität nach der von Kredich und Tomkins beschriebenen Methode, J. Biol. Chem. 241: 4955 - 4965 (1966), vorgenommen werden. Bei diesem Test enthält das Enzym-Testgemisch das Substrat L-Serin und den Cofaktor Acetyl-Coenzym A. Die Reaktion wird durch Enzymzugabe gestartet und über die Abnahme der Absorption bei 232 nm, die durch Spaltung der Thioesterbindung im Acetyl-Coenzym A hervorgerufen wird, in einem Spektralphotometer verfolgt.

Der beschriebene Enzymtest eignet sich für die Bestimmung der Cystein-Sensitivität jedes Serin-Acetyltransferase-Enzyms, einschließlich der Enzyme mit modifiziertem Carboxy-Terminus. Die Hemmung der Serin-Acetyltransferase-Aktivität wird in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von L-Cystein im Reaktionsansatz getestet. Die katalytische Aktivität der verschiedenen Serin-Acetyltransferase-Enzyme wird in An- und Abwesenheit von L-Cystein bestimmt und daraus die Hemmkonstante K_i ermittelt (Kredich und Tomkins, J. Biol. Chem., 241, 4955-4965 (1966)).

In den meisten Fällen bevorzugt wird eine enzymatisch aktive Serin-Acetyltransferase mit einer verringerten Cystein-Sensitivität. Für andere Vorhaben kann eine gleichzeitige Reduzierung der Endprodukt-Sensitivität und der katalytischen Aktivität erstrebenswert sein.

In der Regel ist eine starke Überexpression einer Endprodukt-resistenten Serin-Acetyltransferase nicht wünschenswert, da das dabei zu viel gebildete O-Acetylserin, L-Cystein oder davon abgeleitete Metaboliten sich in der Zelle anhäufen, diese toxisch machen und eine Selektion von Mutanten mit reduzierter Serin-Acetyltransferase-Aktivität hervorrufen könnte. Deshalb werden die feedbackresistenten *cysE*-Allele bevorzugterweise als singuläre Kopien mittels üblicher Verfahren in das Genom integriert.

- 15 -

Methoden für die Integration singulärer Gene in das Chromosom mit Hilfe geeigneter Vektoren sind Stand der Technik (z.B. Winans et al., 1985; J. Bacteriol. 161: 1219 - 1221; Shevell et al., 1988; J. Bacteriol. 170: 3294 - 3296; Kulakauskas et al. 1991, J. Bacteriol. 173: 2633 - 2638).

Es ist ebenfalls bevorzugt, die feedbackresistenten Serin-Acetyltransferasen auf Plasmiden mit niedriger Kopienzahl zu exprimieren.

Bekanntermaßen weist der Expressionsvektor neben dem feedbackresistenten cys-E Allel vorzugsweise noch die im folgenden beschriebene, zusätzlichen Elemente auf.

Die auf dem Vektor befindlichen, kodierenden Sequenzen sind vorteilhafterweise mit regulatorischen Elementen, die für die Expression der kodierenden Sequenzen in dem gewünschten Ausmaß notwendig sind, verknüpft.

Beispiele dieser regulatorischen Elemente sind Promotoren, ribosomale Bindungsstellen und Terminations-Sequenzen. In den meisten Fällen werden die nativen, regulatorischen cysE-Sequenzen für die Expression der erfindungsgemäßen Mutanten verwendet. Es können jedoch auch beliebige andere regulatorische Sequenzen eingesetzt werden.

Neben den regulatorischen Elementen befinden sich auf dem Expressionsvektor vorzugsweise auch Sequenzen, die für selektive Marker und/oder Reporter-Gene kodieren. Die Expression derartiger Selektionsmarker erleichtert die Identifizierung von Transformanten. Als Selektionsmarker geeignet sind Gene, die für eine Resistenz gegenüber z.B. Ampicillin, Tetracyclin, Kanamycin, Chloramphenicol oder anderen Antibiotika kodieren.

- 16 -

Wenn die erfindungsgemäße Mutante extrachromosomal repliziert werden soll, sollte der Plasmidvektor vorzugsweise einen Ursprungspunkt der Replikation enthalten. Die Strategien zur Integration von Genen in das Chromosom mit Hilfe von Vektoren, denen der Ursprungspunkt der Replikation entfernt wurde, sind Stand der Technik (Winans et al., 1985; J. Bacteriol. 161: 1219 - 1221; Shevell et al., 1988; J. Bacteriol. 170: 3294 - 3296; Kulakauskas et al. 1991, J. Bacteriol. 173: 2633 - 2638).

Beispiele für Vektoren, die in E. coli autonom replizierbar sind, sind bei Pouwels, P.H., Enger-Valk, B.E., Brammer, W.J. 1985, Cloning Vectors, Elsevier, Amsterdam aufgeführt.

Solche Vektoren sind beispielsweise:

- Plasmide mit hoher Kopienzahl wie z.B. pBR322, pUC18
- Plasmide mit mittlerer bis niedriger Kopienzahl wie z.B. pACYC184, pACYC177 und pSC101
- Phagenvektoren wie z.B. M13-Vektoren.

Bevorzugt geeignet sind Vektoren mit mittlerer bis niedriger Kopienzahl; besonders bevorzugt sind Vektoren mit einem p15A-Replikon, wie pACYC184 (ATCC37033) oder pACYC177 (ATCC37031) geeignet.

Eine große Anzahl von Vektoren für andere Bakterien sind ebenfalls in der Literatur beschrieben (Pouwels, P.H., Enger-Valk, B.E., Brammer, W.J. 1985, Cloning Vectors, Elsevier, Amsterdam). Mit diesen Vektoren ist die Expression der erfindungsgemäßen Mutanten in anderen Bakterien möglich.

Geeignete rekombinante Vektoren können mit den Standardtechniken zur Herstellung rekombinanter DNS erzeugt

- 17 -

werden. Diese Techniken sind ausführlich in Standardlehrbüchern dargestellt.

Ein geeigneter Wirtstamm wird mit einem Expressionsvektor, der die für eine Cystein-insensitive Serin-Acetyltransferase kodierende Transkriptionseinheit enthält, transformiert.

Als Wirtsstämme werden Stämme, die Cystein-sensitive Proteine enthalten, wie z.B. Prokaryonten oder Hefen verwendet.

Vorzugsweise werden E.coli Wildtypstämme oder Stämme verwendet, in welchen das endogene cysE-Gen inaktiviert ist und durch ein erfindungsgemäße cysE-Gen komplementiert wird. Derartige Zellsysteme eignen sich für die Überproduktion von L-Cystein und daraus abgeleiteten Metabolite.

Bei der Fermentation von Stämmen, enthaltend mindestens ein feedbackresistentes cysE-Allel, zeigt sich, daß Stämme, die ein feedbackresistentes cysE-Allel mit einem K_i -Wert zwischen 0,015 und 2,3 mM in Gegenwart von 1 mM L-Serin und 0,1 mM Acetyl-CoA beherbergen, signifikant größere Mengen an Cystein ausscheiden.

Erfindungsgemäße Serin-Acetyltransferasen lassen sich auch durch Verwendung von Antisense-RNA erzeugen. Es gehört zum Stand der Technik, durch die sogenannte Umkehrgenetik (Reverse Genetik) unter Verwendung von Antisense-RNA gezielt Genaktivität zu blockieren oder zu modifizieren (Inouye, 1988, Gene 72: 25 - 34). Antisense-RNA ist das Transkriptionsprodukt desjenigen DNS-Stranges, der komplementär zu dem für das Protein kodierenden Strang ist. Es ist möglich, die Cystein-Sensitivität der Serin-Acetyltransferase in vivo dadurch zu reduzieren, daß man über Expressionsvektoren Antisense-RNAs produziert, die zu

- 18 -

einem definierten Bereich des 3'-kodierenden Stranges der nativen oder transformierten cysE-Gene komplementär sind. Hierbei lagert sich die Antisense-RNA spezifisch an Zielsequenzen der cysE-mRNA an und verursacht dadurch die Synthese von erfindungsgemäßen Serin-Acetyltransferase-Enzymen, die am Carboxyterminus verkürzt sind und analog den Deletionsmutanten von Beispiel 3 gegenüber dem Inhibitor L-Cystein eine verringerte Sensitivität aufweisen.

Eine zusätzliche Aufgabe war es, für eine optimale Cysteinüberproduktion mittels erfindungsgemäßer Mikroorganismen geeignete Schwefelquellen bereitzustellen.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß eine intrazelluläre Überproduktion von O-Acetylserin, ausgelöst durch Verwendung der erfindungsgemäßen Serin-Acetyltransferase-Mutanten in Verbindung mit einem geeigneten Nährmedium, zu einem deutlichen Anstieg der extrazellulären Cysteinkonzentration führt. Demnach sind die erfindungsgemäßen Serin-Acetyltransferase-Mutanten geeignet für eine Cystein-Überproduktion.

Hierfür muß einem erfindungsgemäßen Mikroorganismus im Produktionsmedium eine ausreichende Menge an Schwefeldonoren bereitgestellt werden.

Geeignete Schwefeldonoren für eine Cysteinüberproduktion sind alle anorganischen Schwefelverbindungen. Bevorzugt sind Sulfate, Sulfite, Sulfide, Dithionite, und Thiosulfate geeignet. Besonders bevorzugt ist Thiosulfat zur optimalen Cysteinproduktion geeignet.

Eine weitere Steigerung der Cysteinausbeute kann durch zusätzliche Überexpression der sulfatreduzierenden (kodiert durch die Gene cysD, C, H, G, I, J) und der sulphydrierenden

Enzyme (kodiert von den Genen cysK und cysM) erzielt werden.

Eine weitere Steigerung der Cysteinausbeute ist möglich

- a) durch eine Deregulierung des Regulatorproteins cysB auf Genebene im Sinne einer konstitutiven Expression. Das cysB-Protein fungiert als übergeordnetes Regulationsprotein der Cystein-Biosynthese in E.coli (Kredich, N. M., 1987, Biosynthesis of Cysteine. In: Neidhardt F. C., Ingraham, J. L., Magasanik, B., Low. K. B., Schaechter, M., Umberger, H. E. (eds) Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology, Vol. 1. American society for Microbiology, Washington D. C., 419 - 428).
- b) durch Kombination von ser-A Genen, ausgewählt aus der Gruppe serA-Wildtyp und serA-Genen kodierend für eine Phosphoglyceratdehydrogenase mit verringerter Serinsensitivität mit erfindungsgemäßen cys-E Genen.
- c) durch externe Zufütterung von Serin.

Bevorzugterweise wird das Gen der nativen, Cystein-sensitiven Serin-Acetyltransferase im Wirtsstamm inaktiviert, so daß eine alleinige Synthese der über Transformation in den jeweiligen Stamm eingeführten Cystein-insensitiven Serin-Acetyltransferase gewährleistet ist. Es existieren zahlreiche Vorschriften über die Inaktivierung nativer Gene in E. coli (Hamilton et al., 1989, J. Bacteriol. 171: 4617 - 4622; Russel et al., 1989, J. Bacteriol. 171: 2609 - 2613; Shen and Huang, 1986, Genetics 112: 441 - 457; Jasin and Schimmel, 1984, J. Bacteriol. 159: 783 - 786).

- 20 -

Ebenso bevorzugt wird die Integration einer singulären Kopie desjenigen Gens, das für eine veränderte Serin-Acetyltransferase kodiert, in das Wirtsgenom.

Beschreibungen und Referenzen für diese Techniken sind in folgenden Publikation zu finden: Shevell et al., 1988, J. Bacteriol. 170: 3294 - 3296; Kulakauskas et al., 1991, J. Bacteriol. 173: 2633 - 2638.

Vorzugsweise werden cysE-Allele unterschiedlichen K_i 's auf einen Vektor niedriger Kopienzahl kloniert und in den entsprechenden Produktionsstamm transformiert.

Fig. 1 zeigt die Biosynthese von L-Methionin, ausgehend von Homoserin.

Fig. 2 zeigt die Biosynthese von Glutathion, ausgehend von Glutamat.

Fig. 3 zeigt die Biosynthese von Biotin, ausgehend von Dethiobiotin.

Fig. 4 zeigt die Biosynthese von L-Cystein in E. coli, ausgehend von Glucose.

Fig. 5 zeigt die Aminosäureabfolge der Serin-Acetyltransferase aus E. coli.

Fig. 6 zeigt die DNS-Sequenz des E. coli cysE-Gens und die von dieser Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz der Serin-Acetyltransferase.

Fig. 7 zeigt die Restriktionskarte des Plasmids pP1 aus Beispiel 1 enthaltend ein feedbackresistentes cysE-Allel, kloniert als 2.25 kb PvuII-Fragment in pUC19.

- 21 -

Fig. 8 zeigt das Plasmid pPC43 aus Beispiel 2 , enthaltend das cysE-Wildtyp-Gen als 1.15 kb großes EcoRI/BamHI-Fragment in pBluescript.

Fig. 9 zeigt die Plasmidkarte von pACYC184-LH aus Beispiel 3 enthaltend ein feedbackresistentes cysE-Allel mit carboxyterminaler Deletion, und aus Beispiel 4 enthaltend ein feedbackresistentes cysE-Allel mit verschiedenen Basenaustauschen.

Die folgenden Beispiele dienen der weiteren Erläuterung der Erfindung:

Beispiel 1

Isolierung von *E. coli*-Mutanten mit Cystein-insensitiven Serin-Acetyltransferase-Enzymen

Durch Reversion auxotropher *E. coli*-Stämme ist es möglich, Regulationsmutanten zu erzeugen. Mutanten mit den gewünschten Eigenschaften (Cystein-Insensitivität der Serin-Acetyltransferase) werden unter den Revertanten Cystein-auxotropher cysE-*E. coli*-Stämme gesucht.

Für die Isolierung der Revertanten wurden die Cystein-auxotrophen *E. coli*-Stämme JM15 (CGSC # 5042: cysE50, tfr-8), und JM39 (CGSC # 5043: cysE51, tfr-8), hinterlegt bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen in Braunschweig unter der Hinterlegungsnummer DSM 10173 verwendet. Zur Erzeugung von Cystein-prototrophen Revertanten wurden diese Stämme mit dem Mutagen Nitrosoguanidin nach Miller, J. H. (1972), Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Press: 125 - 129, Cold Spring Harbor Laboratory behandelt. Auf

Cystein-freiem Minimalmedium wurde nach Cystein-prototrophen Revertanten gesucht. Etwa 1000 der erhaltenen Revertanten wurden im Kreuzfütterungsexperiment zunächst auf Cysteinausscheidung getestet. Dazu wurden die zu testenden Revertanten auf Cystein-freies Minimalmedium (12 g/L K_2HPO_4 , 3 g/L KH_2PO_4 , 5 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 0,3 g/L $MgSO_4 \times 7 H_2O$, 0,015 g/L $CaCl_2 \times 2 H_2O$, 0,002 g/L $FeSO_4 \times 7 H_2O$, 1 g/L $Na_3Citrat \times 2 H_2O$, 0,1 g/L NaCl, 15 g/L Bacto-Agar, 1 ml/L Spurenelementlösung, bestehend aus 0,15 g/L $Na_2MoO_4 \times 2 H_2O$, 2,5 g/L H_3BO_3 , 0,7 g/L $CoCl_2 \times 6 H_2O$, 0,25 g/L $CuSO_4 \times 5 H_2O$, 1,6 g/L $MnCl_2 \times 4 H_2O$, 0,3 g/L $ZnSO_4 \times 7 H_2O$, das mit 1 % Glucose supplementiert und mit 5×10^6 Zellen des Cystein-auxotrophen Indikatorstammes JM39 pro ml beimpft war, ausgebracht und 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Der Radius des Fütterhofes um die Testkolonie (Halo) wurde als semiquantitatives Maß für die Cysteinausscheidung durch den Teststamm genommen. Alle Revertanten, die eine Wachstumszone größer als 2 mm aufwiesen, wurden als positiv eingestuft und nach mehreren Reinigungsausstrichen isoliert und konserviert.

Zur Untersuchung der biochemischen Grundlage für die Cysteinausscheidung der Revertanten wurde die Aktivität der Serin-Acetyltransferase in vitro bestimmt, sowie ihre Hemmbarkeit durch Cystein gemessen. Für die Bestimmung wurden S30-Extrakte (20 min bei 30 000 g und 4°C zentrifugierte Zellaufbrüche) der ausgewählten Revertanten, der Ausgangsstämme sowie des Vergleichsstammes E. coli W3110 (ATTC 27325) verwendet. Es wurde eine Reihe von Revertanten gefunden, deren Serin-Acetyltransferase-Aktivität in Gegenwart verschiedener Konzentrationen des Inhibitors L-Cystein noch eine signifikante Restaktivität aufwies (K_i -Wert zwischen 5 und 50 μM).

- 23 -

Zur Bestimmung der Befähigung zur Cysteinausscheidung im Flüssigmedium mittels quantitativer Cysteinbestimmung wurden 50 ausgewählte cysE-Revertanten in 20 ml Standardproduktionsmedium über einen Zeitraum von 48 Stunden bei 30°C und 170 Upm inkubiert. Das Standardproduktionsmedium bestand aus 15 g/L Glucose, 0,08 g/L Bactotrypton, 0,04 g/L Hefeextrakt, 5 mg/L Vitamin B1, 3 g/L KH_2PO_4 , 12 g/L K_2HPO_4 , 0,3 g/L $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 0,1 g/L NaCl, 5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 14,7 mg/L $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 2 mg/L $\text{FeSO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 1 g/L $\text{Na}_3 \text{ Citrat} \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 5 g/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ und 1 ml/L Spurenelementlösung (vgl. oben). Nach 24 und 48 Stunden wurde jeweils eine Probe (10 µl) entnommen, gegebenenfalls verdünnt, und im zellfreien Überstand die Cysteinkonzentration calorimetrisch nach Gaitonde, M. K. (1967), Biochem. J. 104: 627 - 633, bestimmt. Das Ausmaß der Cysteinausscheidung dieser Mutanten variierte von 5-60 mg/L Cystein im Kulturüberstand. Im E.coli-Wildtypstamm hingegen konnte vergleichsweise keinerlei Cysteinausscheidung nachgewiesen werden. Aus diesem Screening wurden 8 Revertanten ausgewählt, deren Cysteinausscheidung zwischen 40 und 60 mg/L lag.

Für die exakte Analyse der genetischen Grundlage der Endprodukt-Resistenz der Serin-Acetyltransferasen dieser 8 Mutanten wurden deren cysE-Strukturgene kloniert und deren DNS-Sequenz bestimmt.

Da die DNS-Sequenz des cysE-Wildtyp-Gens sowie die chromosomale Restriktionskarte der das cysE-Gen flankierenden Regionen von E. coli bekannt ist (Denk und Böck, 1987, J. Gen. Microbiol. 133: 515 - 525), weiß man, daß das cysE-Strukturgen auf einem 2,25 kb großen PvuII-DNS-Fragment liegt.

- 24 -

Zur Klonierung der für die Cystein-insensitiven Serin-Acetyltransferasen kodierenden cysE-Gene wurde die chromosomale DNS der selektierten Revertanten vollständig mit PvuII hydrolysiert, das DNS-Hydrolysat über ein präparatives Agarosegel aufgetrennt und die DNS im Größenbereich von 2 - 3 kb isoliert. Das isolierte PvuII-Hydrolysat wurde mit dem SmaI-linearisierten und mit alkalischer Phosphatase dephosphorylierten Plasmid-Vektor pUC19 (erhältlich bei der Fa. Boehringer Mannheim) mittels T4 DNS-Ligase verknüpft.

Der Cystein-auxotrophe cysE-Stamm JM15 (CGSC#5042) wurde mit dem jeweiligen Ligationsgemisch transformiert und die Selektion auf cysteinfreiem, ampicillinhaltigem (50 mg/L) Minimalmedium vorgenommen. Die selektierten und die die Cystein-Auxotrophie des Wirtsstammes komplementierenden Plasmide (vgl. Fig. 7) wiesen im Restriktionsmuster das für das cysE-Gen erforderliche Spaltmuster auf (Denk und Böck, 1987, J. Gen. Microbiol. 133: 515 - 525). Auch im Kreuzfütterungstest verursachten die selektierten Transformanten ein intensives Wachstum des Indikatorstammes JM35 (Halo > 4 mm). Die Aktivitätsbestimmung der Serin-Acetyltransferase in Zellextrakten dieser cysE-Mutanten, die durch 20 min Zentrifugation bei 30 000 g und 4°C gewonnen wurden, ergab eine reduzierte Sensitivität gegenüber L-Cystein. Zur exakten Identifizierung der zur Endprodukt-Resistenz führenden Veränderungen im Strukturgen der einzelnen cysE*-Allele wurde deren DNS unter Verwendung cysE-Gen spezifischer Oligonukleotide sequenziert und die ermittelten Nukleotidsequenzen mit der des cysE-Wildtypgens verglichen. Dieser Vergleich der Nukleotidsequenzen ergab die in folgender Tabelle 2 zusammengefaßten Unterschiede zur DNS- und Aminosäuresequenz der Wildtypform (vgl. Fig. 5 und 6).

Tab.2: Feedbackresistente *cysE*-Allele, entstanden durch chemische Mutagenese

| <i>cysE</i> -Mutante | Nukleotid- Austausch (Nr.) | Aminosäure- Austausch (Nr.) | K _i (μM) |
|----------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------|
| <i>cysEII</i> | GGC->AGC (934) | Gly238->Ser238 | 10 |
| <i>cysEIII</i> | GGT->GAT (716) | Gly165->Asp165 | 10 |
| <i>cysEVII</i> | GCT->GTT (932) | Ala237->Val237 | 10 |
| <i>cysEX</i> | ACG->GCG (721) | Thr167->Ala167 | 50 |
| <i>cysEXI</i> | GGT->AGT (955) | Gly245->Ser245 | 700 |
| | ACG->GCG (721) | Thr167->Ala167 | |
| <i>cysEXII</i> | AAA->CAA (511) | Lys97->Gln97 | 40 |
| | GGC->AGC (934) | Gly238->Ser238 | |
| | TTT->TTG (1023) | Phe267->Leu267 | |
| <i>cysEXIII</i> | GTT->GCT (713) | Val164->Ala164 | 30 |
| | TTT->TTG (1023) | Phe267->Leu267 | |
| <i>cysEXVI</i> | GAT->GGT (971) | Asp250->Gly250 | 50 |
| | AAG->TAG (973) | Lys251->Stop251 | |

Beispiel 2

Erzeugung von Endprodukt-insensitiven Serin-Acetyltransferasen durch gezielte Basenaustausche im *cysE*-Strukturgen

In Beispiel 1 wurden insgesamt 8 verschiedene *cysE*-Allele beschrieben, die aufgrund von Basenaustauschen und damit einhergehender Aminosäureveränderungen eine beträchtliche Insensitivierung der Serin-Acetyltransferase gegenüber dem Inhibitor L-Cystein aufweisen. Diese veränderten Enzyme unterscheiden sich nicht nur in der Position der zur Resistenz führenden Aminosäureaustausche, sondern teilweise auch im Maß der Sensitivität gegenüber dem Inhibitor L-

- 26 -

Cystein. Durch ortsspezifische Mutagenese wurden endprodukt-resistente Serin-Acetyltransferase-Enzyme mit neuen Eigenschaften konstruiert, in welche die in Beispiel 1 beschriebenen Aminosäureaustausche untereinander kombiniert wurden. Die dafür notwendigen Mutagenesen wurden gemäß dem Stand der Technik nach der von Kunkel et al. (1987), Meth. Enzymol. 154: 367 - 382, beschriebenen Methode durchgeführt.

Als Ausgangsplasmid für die Mutagenesen wurde das in Fig. 8 dargestellte cysE-Plasmid pPC43 (hinterlegt bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen, Braunschweig, unter der Hinterlegungsnummer DSM 10171) verwendet, welches das 1,15 kb große cysE-Wildtypgen in der EcoRI-BamHI-Stelle des Phagemid-Vektors pBluescriptII SK+ (Fa. Stratagene, Heidelberg) enthält. Dieses cysE-WT-Gen wurde nach der Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki et al. 1988, Science 239: 487 - 491) aus der genomischen DNS des E. coli Wildtypstammes W3110 (ATTC 27325) amplifiziert. Verwendet wurden die Oligonukleotide cysE-fw1 (SEQ ID NO: 3) ("sense-Primer") und cysE-rev1 (SEQ ID NO: 4) ("antisense-Primer"). Die Nukleotidsequenz dieser Primer setzt sich wie folgt zusammen:

cysE-fw1: (SEQ ID NO: 3)

5'-GCCTGGATCCTGCAGTCGACCTGGCGCATCGCTTCGGCGTTG-3'

der fett markierte Anteil entspricht Basen 9-30 aus der cysE-DNS-Sequenz von Fig. 6, unterstrichen ist die inkorporierte BamHI-Stelle.

cysE-rev1: (SEQ ID NO: 4)

5'-GTAGGAGCTCTGCAGAATTCGGGTATCCGGGAGCGGTATTG-3',

der fett markierte Anteil entspricht Basen 1106-1126 aus der *cysE*-DNS-Sequenz von Fig. 6, unterstrichen ist die inkorporierte *EcoRI*-Stelle.

Die PCR-Experimente wurden in 30 Zyklen in Gegenwart von 200 μ M Deoxynukleotidtriphosphaten (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), je 1 μ M des entsprechenden Oligonukleotids, 100 ng W3110-DNS, Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0.01 % Gelatine) und 5 Einheiten einer hitzestabilen Vent-DNS-Polymerase (Fa.Biolabs) in einem Thermocycler (Gene-ATAQ-Controller, Fa.Pharmacia) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 96 °C, 1,5 min; 62 °C, 1 min; 72 °C, 3 min. Das Amplifikationsprodukt wurde mit BamHI und *EcoRI* hydrolysiert, über ein Agarosegel gereinigt und als 1,15 kb großes DNS-Fragment in den mit BamHI und *EcoRI* linearisierten Phagemid-Vektor BluescriptII SK+ kloniert, wobei das *cysE*-Plasmid pPC43 entstand (Fig. 8).

Die gewünschten Mehrfachmutanten wurden nach folgender Vorgehensweise erstellt:

1) Herstellung des *cysE*-IV-Allels: Doppelmutante Val₂₃₇ + Ser₂₃₈

Ausgehend vom *cysE*-Wildtyp-Plasmid pPC43 wurde durch ortsspezifische Mutagenese unter Verwendung des Mutationsoligonukleotids *cysE*-Mut-1 (SEQ ID NO: 5) (Tab. 3) zunächst an Position 238 an Stelle des Glycins ein Serin und in die dabei erzeugte *cysE*-Mutante pPC34 unter Verwendung des Mutationsoligonukleotids *cysE*-Mut-3 (SEQ ID NO: 6) (Tab. 3) an Position 237 anstelle des Alanins ein Valin eingeführt, wobei das *cysE*-IV-Allel entstand.

- 28 -

2) Herstellung des cysE-VIII-Allels: Doppelmutante Val₂₃₇ + Ile₂₅₆

Ausgehend vom cysE-Wildtyp-Plasmid pPC43 wurde durch ortsspezifische Mutagenese unter Verwendung des Mutationsoligonukleotids cysE-Mut-6 (SEQ ID NO: 7) (Tab. 3) an Position 256 für das Methionin ein Isoleucin eingeführt, wobei das cysEI-Allel entstand. In dieses wurde mittels Mutationsoligonukleotid cysE-Mut-3 (SEQ ID NO: 6) (Tab. 3) anstelle des Alanins an Position 237 ein Valin eingeführt. Dabei entstand das Allel cysE-VIII.

3) Herstellung des CysE-VI-Allels: Doppelmutante Ser₂₃₈ + Ile₂₅₆

In das cysE-I-Allel (Mutante Ile₂₅₆) wurde mit Hilfe des Mutationsoligonukleotids cysE-Mut-1 (SEQ ID NO: 5) (Tab. 3) an Position 238 anstelle des Glycins ein Serin eingeführt, wobei das cysE-VI-Allel entstand.

4) Herstellung des cysE-V-Allels: Dreifachmutante Val₂₃₇ + Ser₂₃₈ + Ile₂₅₆

In dem cysE-IV-Allel (Doppelmutante Val₂₃₇ + Ser₂₃₈) wurde mit Hilfe des Mutationsoligonukleotids cysE-Mut-6 (SEQ ID NO: 7) (Tab. 3) das Methionin an Position 256 durch ein Isoleucin ersetzt. Dabei entstand das cysE-V-Allel.

5) Herstellung des cysE-XIV-Allels: Doppelmutante Ala₁₆₇ + Stop₂₅₁

Ausgehend vom Allel cysE-Del₂₅₅ (vgl. Beispiel 3) wurde unter Verwendung des Mutationsoligonukleotids cysE-Mut-10 (SEQ ID NO: 8) (Tab. 3) an Position 167 anstelle des Threonins ein Alanin eingeführt, wobei das cysE-XIV-Allel entstand.

- 29 -

6) Herstellung des cysE-XVII-Allels: Doppelmutante Asp₁₆₅ + Ala₁₆₇

Ausgehend von cysE-III-Allel (Mutante Asp₁₆₅, vgl. Beispiel 1) wurde mit Hilfe des Oligonukleotids cysE-Mut-10 (SEQ ID NO: 8) (Tab. 3) die Aminosäure Threonin an Position 167 durch ein Alanin ersetzt. Hierbei entstand das Allel cysE-XVII.

7) Herstellung des cysE-XXIII-Allels: Dreifachmutante Ala₁₆₇ + Val₂₃₇ + Ser₂₃₈

In das cysE-IV-Allel (Doppelmutante Val₂₃₇+Ser₂₃₈) wurde unter Verwendung des Mutationsoligonukleotids cysE-Mut-10 (SEQ ID NO: 8) (Tab. 3) an Position 167 anstelle des Threonins ein Alanin eingeführt, wobei das cysE-XXIII-Allel entstand.

Die Korrektheit der eingeführten Mutationen wurde durch DNS-Sequenzanalyse des gesamten Strukturgens der jeweiligen Mutante überprüft. Eine Übersicht der cysE*-Mehrfachmutanten findet sich in Tab. 4.

Für die Bestimmung der biochemischen Parameter wie Enzymaktivität und Hemmkonstante K_i wurde analog zu der Beschreibung in Beispiel 1 vorgegangen.

Tab. 3: Oligonukleotide, verwendet für die ortsspezifische Mutation zur Erzeugung neuer feedbackresistenter cysE-Allele

| SEQ ID NO: | Mutations-oligonukleotid | Nukleotidsequenz | Position in der Fig. 6 | Aminosäureaustausch |
|------------|--------------------------|--|------------------------|---------------------|
| 5 | cysE-Mut-1 | 5'-GCCGCTAGCGTTCCGGCT-3' | 928-945 | Gly238->Ser238 |
| 6 | cysE-Mut-3 | 5'-CCGCCGCATACCA CGCGTT -3' | 913-933 | Ala237->Val237 |
| 7 | cysE-Mut-6 | 5'-CCATCAATGGATATAGACCAGCAT-3' | 976-999 | Met256->Ile256 |
| 8 | cysE-Mut-10 | 5'-GTCGTTGGTGAAGCGCGGTGATT-3' | 709-732 | Thr167->Ala167 |

Tab. 4: Feedbackresistente cysE-Allele, entstanden durch gezielte ortsspezifische Mutagenese

| cysE-Mutante | Nukleotid- Austausch (Nr.) | Aminosäure Austausch (Nr.) | K _i (μM) |
|--------------|---|--|---------------------|
| cysEIV | GCT->CTT(932) GGC->AGC(934) | Ala237->Val237 Gly238->Ser238 | 40 |
| cysEV | GCT->GTT(932) GGC->AGC(934) ATG->ATA(990) | Ala237->Val237 Gly238->Ser238 Met256->Ile256 | 10 |
| cysEVI | GGC->AGC(934) ATG->ATA(990) | Gly238->Ser238 Met256->Ile256 | 10 |
| cysEVIII | GCT->GTT(932) ATG->ATA(990) | Ala237->Val237 Met256->Ile256 | 30 |
| cysEXIV | ACG->GCG(721) ATG->TAG(988+989) | Thr167->Ala167 Met256->Stop256 | >1000 |
| cysEXVII | GGT->GAT(716) ACG->GCG(721) | Gly165->Asp165 Thr167->Ala167 | 100 |
| cysEXXIII | ACG->GCG(721) GCT->GTT(932) GGC->AGC(934) | Thr167->Ala167 Ala237->Val237 Gly238->Ser238 | 2300 |

Beispiel 3**Erzeugung von Endprodukt-insensitiven Serin-Acetyltransferasen durch kontrollierte Verkürzung des Carboxy-Terminus des Enzyms mittels PCR**

Gezielte Veränderungen von einzelnen oder mehreren Aminosäuren innerhalb eines Proteins sind Stand der Technik und lassen sich mittels PCR-Technologie (Saiki et al., 1988, Science 239: 487 - 491) unter Verwendung geeigneter Mutationsprimer auf DNS-Ebene gut durchführen. Für die Expression der veränderte Proteine werden die erhaltenen PCR-Produkte in ein geeignetes Plasmid-/Wirtssystem kloniert.

Unter Verwendung der in Tab. 5 dargestellten Oligonukleotid-Primer wurden aus der genomischen DNS des E.coli Wildtypstammes W3110 (ATTC 27325) cysE-Mutanten mit carboxyterminalen Deletionen unterschiedlicher Länge hergestellt, die in Tab. 6 zusammengestellt sind.

Die PCR-Experimente wurden in 30 Zyklen in Gegenwart von 200 μ M Deoxynukleotidtriphosphaten (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), je 1 μ M der Oligonukleotide des "sense-Primer" cysE-LHfw1 (SEQ ID NO: 9) und dem entsprechenden "antisense-Primer" (SEQ ID NO: 10-23) (Tab. 5), 100 ng W3110-DNS, Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,01 % Gelatine) und 5 Einheiten einer hitzestabilen Vent-DNS-Polymerase (Fa. Biolabs) in einem Thermocycler (Gene-ATAQ-Controller, Fa. Pharmacia) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 96 °C, 1,5 min; 62 °C, 1 min; 72 °C, 3 min.

- 33 -

cysE-LHfw1 (SEQ ID NO: 9)

5'-TGGACCAGAGCTCTGGCTGGCGCATCGCTTCGGCGTTG-3'

Der fettmarkierte Anteil entspricht Basen 9-30 der cysE-Sequenz von Fig. 6, unterstrichen ist die inkorporierte BstXI/SacI-Stelle.

Das nach Amplifikation entstandene Produkt wurde mit den Enzymen SacI und NsiI hydrolysiert, anschließend über ein Agarosegel gereinigt und das jeweils isolierte cysE-DNA-Fragment in den mit SacI und NsiI linearisierten Vektor pACYC184-LH /DSM 10172) (vgl. Fig. 9) ligiert. Der jeweilige Ligaseansatz wurde in den Cystein-auxotrophen cysE-Stamm JM15 (CGSC#5042) transformiert und die Selektion auf Cystein-freiem, Tetracyclin-haltigem (20 mg/l) Minimalmedium vorgenommen.

Die aus dieser Klonierung hervorgegangenen Plasmide wurden entsprechend ihres Deletionsausmaßes als pACYC184/cysE-Del bezeichnet (vgl. Fig. 9 zur Plasmidkarte). Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität und der Hemmkonstante K_i sowie der Kreuzfütterungstest wurden analog der Beschreibung in Beispiel 1 vorgenommen. Die Korrektheit der eingeführten Deletionen wurde durch DNS-Sequenzanalyse bestätigt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tab. 6 zusammengestellt.

Tab.5 Antisense-Oligonukleotide für die Herstellung von cysE-Allelen mit carboxyterminalen Deletionen

| SEQ ID NO | Mutations-oligonukleotid | Nukleotidsequenz | Position in der Fig. 6 |
|-----------|--------------------------|--|------------------------|
| 10 | cysE-Del270 | 5'-CTCGATGCATTACGTATTACCCATACTCAAAATCTATGGTTAATACC-3' | 1006-1032 |
| 11 | cysE-Del268 | 5'-CTCGATGCATTACGTATTACTCAAAATGTATGGTTAATACCGTTGAA-3' | 1000-1026 |
| 12 | cysE-Del263 | 5'-CTCGATGCATTACGTATTAAATACCGTTGAAATGCTGGTCCATATC-3' | 985-1011 |
| 13 | cysE-Del259 | 5'-CTCGATGCATTACGTATTAAATGCTGGTCCATATCCATTGATGGCTT-3' | 973- 999 |
| 14 | cysE-Del258 | 5'-CTCGATGCATTACGTATTACTGGTCCATATCCATTGATGGCTTATC-3' | 970- 996 |
| 15 | cysE-Del257 | 5'-CTCGATGCATTACGTATTAGTCCATATCCATTGATGGCTTATCGCTG-3' | 966- 993 |
| 16 | cysE-Del256 | 5'-CTCGATGCATTACGTATTACATATCCATTGATGGCTTATCGCTGTC-3' | 964- 990 |
| 17 | cysE-Del255 | 5'-CTCGATGCATTACGTATTAAATCCATTGATGGCTTATCGCTGTCGG-3' | 961- 987 |
| 18 | cysE-Del250 | 5'-CTCGATGCATTACGTATTAAATCGCTGTCGGTTTACCGACAATACG-3' | 946- 972 |
| 19 | cysE-Del249 | 5'-CTCGATGCATTACGTATTAGCTGTCTGGTTTACCGACAATACGAGC-3' | 943- 969 |
| 20 | cysE-Del248 | 5'-CTCGATGCATTACGTATTAGTCTGGTTTACCGACAATACGAGCCGG-3' | 940- 966 |
| 21 | cysE-Del245 | 5'-CTCGATGCATTACGTATTAAACCGACAATACGAGCCGGAAACGCCAGC-3' | 931- 957 |
| 22 | cysE-Del239 | 5'-CTCGATGCATTACGTATTAAACCGAGCGGCTGGTATCCGGCGG-3' | 913- 939 |
| 23 | cysE-Del227 | 5'-CTCGATGCATTACGTATTACAGCACACGGAACCTGGCGCAATCTT-3' | 877- 903 |

Der fett markierte Anteil entspricht den jeweiligen Basen in der Sequenz der Fig. 6, unterstrichen ist die NsiI- Stelle

Tab. 6: Feedbackresistente cysE-Allele, entstanden durch carboxyterminale Deletionen

| cysE-Mutante | Anzahl deletierter Aminosäuren | Terminale Aminosäuren | K _i (μM) |
|--------------|--------------------------------|-----------------------|---------------------|
| cysE-Del271 | 2 | Asp271 | 0 |
| cysE-Del270 | 3 | Gly270 | 0 |
| cysE-Del268 | 5 | Glu268 | 0 |
| cysE-Del263 | 10 | Ile263 | 0 |
| cysE-Del259 | 14 | His259 | 7,5 |
| cysE-Del258 | 15 | Gln258 | 5 |
| cysE-Del257 | 16 | Asp257 | 7,5 |
| cysE-Del256 | 17 | Met256 | 12,5 |
| cysE-Del255 | 18 | Asp255 | 30 |
| cysE-Del250 | 23 | Asp250 | 20 |
| cysE-Del249 | 24 | Ser249 | 15 |
| cysE-Del248 | 25 | Asp248 | 12,5 |
| cysE-Del245 | 28 | Gly245 | 0 |
| cysE-Del239 | 34 | Val239 | 0 |
| cysE-Del227 | 46 | Leu227 | 0 |

Beispiel 4

Transformation eines E. coli-Wirtsstammes mit veränderten Serin-Acetyltransferasen zur Überproduktion von L-Cystein bzw. L-Cystein-verwandten Produkten in Schüttelkolben

Für die Produktion wurde der Vektor pACYC184-LH, der sich durch eine niedrige Kopienzahl auszeichnet, verwendet. Hierfür wurden die cysE-Gene auf den Plasmiden aus den Beispielen 1 und 2 durch PCR amplifiziert.

- 36 -

Die PCR-Experimente wurden in 30 Zyklen in Gegenwart von 200 μ M Deoxynukleotidtriphosphaten (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), je 1 μ M der Oligonukleotide des "sense-Primer" cysE-LHfw1 (SEQ ID NO: 9) und des entsprechenden "antisense Primer" cysE-LHrev1 (SEQ ID NO: 24), 10 ng jeweilige Plasmid-DNA, Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,01 % Gelatine) und 5 Einheiten einer hitzestabilen Vent-DNA-Polymerase (Fa. Biolabs) in einem Thermocycler (Gene-ATAQ-Controller, Fa. Pharmacia) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 96°C, 1,5 min; 62°C, 1 min; 72°C, 3 min.

cysE-LHfw1 (SEQ ID NO: 9)

5'-TGGACCAGAGCTCTGGCTGGCGCATCGCTTCGGCGTTG-3'

Die unterstrichenen Basen entsprechen den inkorporierten Restriktionsschnittstellen BstXI und SacI, die restlichen, fett gedruckten Basen entsprechen Position 9-30 der cysE-Sequenz von Fig. 6.

cysE-LHrev1 (SEQ ID NO: 24),

5'-CTCGATGCATTACGTAGGGGTATCCGGGAGCGGTATTG-3'

Die unterstrichenen Basen entsprechen der inkorporierten Restriktionsschnittstellen NsiI, die restlichen, fett gedruckten Basen entsprechen Position 1106 - 1127 der cysE-Sequenz von Fig. 6.

Das nach der Amplifikation entstandene Produkt wurde mit den Enzymen SacI und NsiI hydrolysiert, anschließend über ein Agarosegel gereinigt und das jeweils isolierte cysE-DNA-

- 37 -

Fragment in den mit SacI und NsiI linearisierten Vektor pACYC184-LH (DSM 10172) ligiert.

Der jeweilige Ligaseansatz wurde in den cysteinauxotrophen cysE-Stamm JM15 (CGSC#5042) transformiert und die Selektion auf cysteinfreiem, tetracyclinhaltigem (20 mg/L) Minimalmedium vorgenommen. Die aus dieser Klonierung hervorgegangene Reihe an feedbackresistenten cysE-Plasmiden wurde als pACYC184/cysE (vgl. Fig. 9) bezeichnet, wobei jeder Klon mit der entsprechenden cysE-Allelnummer versehen wurde.

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität, der Hemmkonstante K_i sowie der Kreuzfütterungstest wurden analog der Beschreibung in Beispiel 1 vorgenommen.

Zur Bestimmung der Produktionskapazität in Flüssigmedium wurden 20 ml des Standardproduktionsmediums mit einer Einzelkolonie beimpft und 48 Stunden bei 30°C und 170 Upm inkubiert. Das Produktionsmedium bestand aus 15 g/L Glucose, 0,08 g/L Bactotrypton, 0,04 g/L Hefeextrakt, 5 mg/L Vitamin B1, 3 g/L KH_2PO_4 , 12 g/L K_2HPO_4 , 0,3 g/L $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 0,1 g/L NaCl, 5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 14,7 mg/L $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 2 mg/L $\text{FeSO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 1 g/L $\text{Na}_3 \text{ Citrat} \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 5 g/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$, 1 ml/L Spurenelementlösung, 0,025 mg/L Tetracyclin. Die Spurenelementlösung setzte sich aus 0,15 g/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 2,5 g/L H_3BO_3 , 0,7 g/L $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, 0,25 g/L $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$, 1,6 g/L $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$ und 0,3 g/L $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ zusammen. Nach 24 und 48 Stunden wurde jeweils eine Probe (10 µl) entnommen, entsprechend verdünnt und im zellfreien Überstand die Produktkonzentration calorimetrisch nach Gaitonde, M. K. (1967), Biochem. J. 104, 627-633, bestimmt. Für den mit unterschiedlichen cysE-Mutanten transformierten Produktionsstamm JM15 wurden dabei Konzentrationen zwischen 50 und 300 mg/L an Cystein gemessen.

Beispiel 5

Konstruktion chromosomal kodierter, feedbackresistenter cysE-Allele mit Hilfe eines rekombinanten λ -Prophagen und Produktion von L-Cystein oder L-Cystein-abgeleiteten Produkten im 1 L-Fermenter

Zur Integration in die chromosomale "attachment site" ($\text{att}\lambda$) wurden die cysE-Allele cysEIV, cysEX und cysEXI in das Plasmid pRS551 (Simons et al., 1987, Gene 53: 85-96) kloniert. Dazu wurde das jeweilige cysE-Allel durch PCR aus dem entsprechenden cysE-Plasmid amplifiziert. Die verwendeten Oligonukleotide cysE-fw1 und cysE-rev1 sind in Beispiel 1 beschrieben. Die Amplifizierung erfolgte wie in Beispiel 3 beschrieben. Die erhaltenen Fragmente wurden mit EcoRI/BamHI gespalten, über ein Agarosegel gereinigt und in den EcoRI/BamHI gespaltenen Vektor pRS551 ligiert. Hierbei entstanden die auf dem Vektor pRS551 basierenden rekombinanten Plasmide pRScysEIV, X und XI.

Durch die Herstellung eines Plattenlysats auf einem pRScysE-tragenden recA^+ -Stamm (z.B. YMC9, ATCC 3397) mit dem λ RS45-Phagen wurde in vivo durch homologe Rekombination ein heterogenes lambda-Lysat erzeugt, das neben λ RS45-Phagen auch rekombinante cysE-Allele-tragende λ RS45-Derivate enthielt (Simons et al., 1987, Gene 53: 85-96).

Zur Selektion auf die rekombinanten RS45-Derivate wurde der cysE-Stamm JM15 verwendet, der mit dem heterogenen lambda-Lysat infiziert und anschließend auf Kanamycin-haltigen (25 mg/L) LB-Platten plattiert wurde. Die erhaltenen lysogenen, Kanamycin-resistenten Klone wurden dann auf ihre Fähigkeit getestet, auf Minimalmediumplatten ohne Cystein zu wachsen. Ein jeweils Cystein-prototropher Klon wurde ausgewählt und

- 39 -

für die Herstellung eines homogenen cysE- λ -Lysats (durch UV-Induktion, Simons et al., 1987, Gene 53: 85-96) verwendet.

Mit diesen jeweils erhaltenen homogenen cysE- λ -Lysaten wurde der Stamm JM 15 infiziert. Die daraus hervorgegangenen Stämme JM15att λ ::cysE, wurden, wie in Beispiel 6 beschrieben, fermentiert. Die jeweiligen Medien enthielten anstelle von Tetracyclin als Selektionsagens jeweils 25 mg/L Kanamycin.

Die Ausbeuten an Cystein lagen mit cysEIV bei 0,5, mit cysEX bei 1,8 und mit cysEXI bei 2,1 g/L (vgl. Tab. 7).

Beispiel 6

Einfluß von verschiedenen, plasmidkodierte cysE-Allelen auf die Produktion von L-Cystein oder L-Cystein-abgeleiteten Produkten im 1 L-Fermenter unter Verwendung des Wirtstammes JM15

20 mL, in einem 100 mL Erlenmeyerkolben befindliches LB Medium (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl) wurden mit einer Einzelkolonie des mit dem jeweiligen cysE-Plasmid transformierten Produktionsstammes JM15 (CGSC#5042) beimpft.

Nach 7-stündiger Inkubation im Bakterienrührer (150 rpm, 30°C) wurden die jeweiligen Vorkulturen in 100 mL SM1-Medium überführt. Das SM1-Medium enthielt 5 g/L Glucose, 5 mg/L Vitamin B1, 3 g/L KH₂PO₄, 12 g/L K₂HPO₄, 0,3 g/L MgSO₄ x 7 H₂O, 0,1 g/L NaCl, 5 g/L (NH₄)₂SO₄, 14,7 mg/L CaCl₂ x 2 H₂O, 2 mg/L FeSO₄ x 2 H₂O, 1 g/L Na₃Citrat x 2 H₂O, 1 ml/L Spurenelementlösung, 25 mg/L Tetracyclin. Die Spurenelementlösung setzte sich zusammen aus 0,15 g/L Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 2,5 g/L H₃BO₃, 0,7 g/L CoCl₂ x 6 H₂O, 0,25 g/L CuSO₄ x 5 H₂O, 1,6 g/L MnCl₂ x 4 H₂O und 0,3 g/L ZnSO₄ x 7 H₂O. Die Kulturen wurden in 1-L-Erlenmeyerkolben bei 30°

- 40 -

C für 17 h mit 150 rpm geschüttelt. Nach dieser Inkubation betrug die OD₆₀₀ zwischen 4 und 5. Die weitere Fermentation wurde in Forschungsfermentern BIOSTAT M der Firma Brauermelungen durchgeführt. Ein Kulturgefäß mit 2 L Gesamtvolumen wurde benutzt.

Das Fermentationsmedium enthielt 15 g/L Glucose, 5 g/L NaCl, 0,3 g/L MgSO₄ x 7 H₂O, 15 mg/L CaCl₂ x 2 H₂O, 75 mg/L FeSO₄ x 7 H₂O, 1 g/L Na₃Citrat x 2 H₂O, 1,5 g/L KH₂PO₄, 1 ml Spurenelementlösung (siehe oben), 5 mg/L Vitamin B₁, 2,5 g/L Hefeextrakt (Difco), 2,5 g/L Trypton (Difco) und 25 mg/L Tetracyclin.

Die Glucosekonzentration im Fermenter wurde zu Beginn durch Zupumpen einer 700 g/L (w/v) Glucoselösung (sterilisiert) auf einen Wert von 15 g/L und der pH-Wert durch Zupumpen von 25% NH₄OH-Lösung auf 7,0 eingestellt. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 10 wurde aus einer sterilen 100 g/L (w/v) Thiosulfat-Stammlösung 300 mg pro Stunde zugefüttert. 100 mL Vorkultur wurden zum Animpfen in das Fermentergefäß gepumpt. Das Anfangsvolumen betrug ca. 1 L. Die Kulturen wurden zunächst mit 400 rpm gerührt und mit 1,5 vvm einer über einen Sterilfilter entkeimten Preßluft begast. Die Fermentation wurde bei einer Temperatur von 30°C durchgeführt.

Der pH-Wert wurde durch automatische Korrektur mit 25 % NH₄OH auf einem Wert von 7,0 gehalten. Die Sauerstoffsättigung in der Fermentationsbrühe sollte zu keinem Zeitpunkt der Fermentation unter 20 % abfallen, sie wurde über die Rührgeschwindigkeit kontrolliert. In zwei- bis dreistündigem Abstand wurden der Glukosegehalt der Nährlösung, die optische Dichte und der Cysteingehalt ermittelt. Die Bestimmung des Glukosegehalts erfolgte enzymatisch mit Hilfe eines Glukoseanalysators der Firma

- 41 -

YSI. Die Glukosekonzentration wurde durch kontinuierliches Zufüttern zwischen 10 und 20 g/L eingestellt.

Der Produktgehalt des Mediums wurde aus dem zellfreien Überstand der Probe calorimetrisch nach Gaitonde, M. K. (1967), Biochem. J. 104, 627 - 633, bestimmt.

Nach 44-50 h wurde die Fermentation abgebrochen. Die produzierten Cysteinmengen in g/L nach 48 h sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Tab. 7: Cysteinausbeute des Produktionsstammes JM 15, transformiert mit unterschiedlichen cysE-Allelen (1L Fermenter)

| cysE-Allel | Cysteinausbeute [g/L] [48 h] |
|---------------------|---------------------------------|
| pACYC184/cysEIV | 1,6 |
| pACYC184/cysEV | 1,3 |
| pACYC184/cysEVI | 1,4 |
| pACYC184/cysEX | 3,4 |
| pACYC184/cysEXI | 3,4 |
| pACYC184/cysEXII | 1,2 |
| pACYC184/cysEXIV | 2,3 |
| pACYC184/cysEXV | 3,0 |
| pACYC184/cysEXVI | 2,2 |
| pACYC184/cysEXXIII | 2,7 |
| pACYC184/cysEDel255 | 3,9 |

Beispiel 7

Produktion von L-Cystein oder L-Cystein abgeleiteten Produkten mit Corynebakterien

Die feedbackresistenten cysE-Allele cysEIV, cysEX, cysEXI und cysEXIV (vgl. Tab. 2 in Beispiel 1) wurden mit den

- 42 -

Restriktionsenzymen BamHI und EcoRI (Fa. Boehringer Mannheim) aus ihren entsprechenden Plasmiden gespalten und das jeweils 1,15 kb große DNS-Fragment über ein Agarosegel gereinigt und isoliert. Das jeweilige DNS-Fragment wurde durch Einwirkung des Klenow-Fragments der DNS-Polymerase I aus E. coli (Fa. Boehringer Mannheim) glattendig gemacht. Der Vektor pWST1 wurde mit dem Restriktionsenzym SmaI (Fa. Boehringer Mannheim) hydrolysiert und mit dem glattendigen DNS-Fragment mittels T4 DNS-Ligase verknüpft. Der Vektor pWST1 ist ein E.coli/Corynebakterien-Schaukelvektor und kann sowohl in E. coli als auch in Corynebakterien replizieren. Das corynebakterielle Replikon dieses Vektors stammt aus dem Stamm Corynebacterium glutamicum ATCC 19223. Die Herstellung des Vektors pWST1 ist in US-A-4,965,197 beschrieben. Der Ligationsansatz wurde benutzt, um die für Cystein auxotrophe Mutante JM15 zu transformieren. Die komplementierenden Plasmide wurden entsprechend ihrer insertierten cysE-Allele pWST1-cysEIV, pWST1-cysEX, pWST1-cysEXI und pWST1-cysEXIV bezeichnet.

Die pWST1-cysE-Plasmide wurden benützt, um das Corynebacterium glutamicum ATCC21851 zu transformieren. Die Transformation erfolgte über Elektroporation nach der bei Liebl, W. et al., 1989, FEMS Microbiol. Letters, 65, 299-304 ausführlich geschilderten Technik. Die Selektion der rekombinanten Klone erfolgte über die plasmidkodierte Kanamycinresistenz auf Agarplatten mit 25 mg/L Kanamycin.

Die Fermentation erfolgte analog den in Beispiel 6 beschriebenen Bedingungen mit der Ausnahme, daß anstelle von Tetracyclin Kanamycin in der Konzentration von 50 mg/L als Selektionsantibiotikum verwendet wurde.

- 43 -

In der Fermentation zeigte sich, daß der Stamm, der das cysEXI-Allel auf einem Plasmid trägt, die höchsten Cystein-Ausbeuten erreicht.

- 44 -

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Consortium fuer elektrochemische Industrie,
GmbH
- (B) STRASSE: Zielstattstr. 20
- (C) ORT: Muenchen
- (D) BUNDESLAND: Bayern
- (E) LAND: Germany
- (F) POSTLEITZAHL: 81379
- (G) TELEFON: 089/748440
- (H) TELEFAX: 089/74844350
- (I) TELEX: 5215553 cons d

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Verfahren zur Herstellung von
O-Acetylserin L-Cystein und L-Cystein-verwandten Produkten

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 25

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

- 45 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 42 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "oligonucleotide"

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (A) BIBLIOTHEK: synthetic
- (B) CLON(E): cysE-fw1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GCCTGGATCC TGCAGTCGAC CTGGCGCATC GCTTCGGCGT GG

42

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 41 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "oligonucleotide"

- 46 -

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (A) BIBLIOTHEK: synthetic
- (B) CLON(E): cysE-rev1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

GTAGGAGCTC TGCAGAATTC GGGTATCCGG GAGCGGTATT G

41

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "oligonucleotide"

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (A) BIBLIOTHEK: synthetic
- (B) CLON(E): cysE-Mut-1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GCCGCTAGCG TTCCGGCT

18

- 47 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "oligonucleotide"

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (A) BIBLIOTHEK: synthetic
- (B) CLON(E): cysE-Mut-2

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

CGTCGTTGAT GAACGGCG

18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "oligonucleotide"

- 48 -

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (A) BIBLIOTHEK: synthetic
- (B) CLON(E): cysE-Mut-3

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

CCGCCGCATA CCACCGCCGT T

21

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "oligonucleotide"

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (A) BIBLIOTHEK: synthetic
- (B) CLON(E): cysE-Mut-6

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

CCATCAATGG ATATAGACCA GCAT

24

- 49 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "oligonucleotide"

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (A) BIBLIOTHEK: synthetic
- (B) CLON(E): cysE-Mut-10

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

GTCGTTGGTG AAGCGGCGGT GATT

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "oligonucleotide"

- 50 -

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (A) BIBLIOTHEK: synthetic
- (B) CLON(E): cysE-LHfw1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

TGGACCAGAG CTCTGGCTGG CGCATCGCTT CGGCGTTG

38

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 46 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "oligonucleotide"

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (A) BIBLIOTHEK: synthetic
- (B) CLON(E): cysE-Del270

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

CTCGATGCAT TACGTATTAC CCATACTCAA ATCTATGGTT AATACC

46

- 51 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 46 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "oligonucleotide"

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (A) BIBLIOTHEK: synthetic
- (B) CLON(E): cysE-Del268

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

CTCGATGCAT TACGTATTAC TCAAATGTAT GGTAAATACC GTTGAA

46

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 46 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "oligonucleotide"

- 52 -

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (A) BIBLIOTHEK: synthetic
- (B) CLON(E): cysE-Del263

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

CTCGATGCAT TACGTATAAA ATACCGTTGA AATGCTGGTC CATATC

46

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 46 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "oligonucleotide"

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (A) BIBLIOTHEK: synthetic
- (B) CLON(E): cysE-Del259

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

CTCGATGCAT TACGTATTAA TGCTGGTCCA TATCCATTGA TGGCTT

46

- 53 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 46 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "oligonucleotide"

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (A) BIBLIOTHEK: synthetic
- (B) CLON(E): cysE-Del258

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

CTCGATGCAT TACGTATTAC TGGTCCATAT CCATTGATGG CTTATC

46

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 47 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "oligonucleotide"

- 54 -

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (A) BIBLIOTHEK: synthetic
- (B) CLON(E): cysE-Del257

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

CTCGATGCAT TACGTATTAG TCCATATCCA TTGATGGCTT ATCGCTG

47

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 46 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "oligonucleotide"

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (A) BIBLIOTHEK: synthetic
- (B) CLON(E): cysE-Del256

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

CTCGATGCAT TACGTATTAC ATATCCATTG ATGGCTTATC GCTGTC

46

- 55 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 46 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "oligonucleotide"

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (A) BIBLIOTHEK: synthetic
- (B) CLON(E): cysE-Del255

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

CTCGATGCAT TACGTATTAA TCCATTGATG GCTTATCGCT GTCTGG

46

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 46 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "oligonucleotide"

- 56 -

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (A) BIBLIOTHEK: synthetic
- (B) CLON(E): cysE-Del250

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

CTCGATGCAT TACGTATTAA TCGCTGTCTG GTTTACCGAC AATACG

46

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 46 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "oligonucleotide"

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (A) BIBLIOTHEK: synthetic
- (B) CLON(E): cysE-Del249

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

CTCGATGCAT TACGTATTAG CTGTCTGGTT TACCGACAAT ACGAGC

46

- 57 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 46 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "oligonucleotide"

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (A) BIBLIOTHEK: synthetic
- (B) CLON(E): cysE-Del248

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

CTCGATGCAT TACGTATTAG TCTGGTTTAC CGACAATACG AGCCGG

46

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 46 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "oligonucleotide"

- 58 -

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (A) BIBLIOTHEK: synthetic
- (B) CLON(E): cysE-Del245

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

CTCGATGCAT TACGTATTAA CCGACAATAC GAGCCGGAAC GCCAGC

46

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 46 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "oligonucleotide"

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (A) BIBLIOTHEK: synthetic
- (B) CLON(E): cysE-Del239

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

CTCGATGCAT TACGTATTAA ACGCCAGCGG CGGTGGTATC CGGCGG

46

- 59 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 46 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "oligonucleotide"

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (A) BIBLIOTHEK: synthetic
- (B) CLON(E): cyse-Del227

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

CTCGATGCAT TACGTATTAC AGCACCACGG AACCTGCGCC AATCTT

46

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "oligonucleotide"

- 60 -

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (A) BIBLIOTHEK: synthetic
- (B) CLON(E): cysE-LHrev1

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

CTCGATGCAT TACGTAGGGG TATCCGGGAG CGGTATTG

38

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 24:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 273 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Escherichia coli
- (B) STAMM: W3110

- 61 -

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ser | Cys | Glu | Glu | Leu | Glu | Ile | Val | Trp | Asn | Asn | Ile | Lys | Ala | Glu | 1 | 5 | 10 | 15 |
| Ala | Arg | Thr | Leu | Ala | Asp | Cys | Glu | Pro | Met | Leu | Ala | Ser | Phe | Tyr | His | 20 | 25 | 30 | |
| Ala | Thr | Leu | Leu | Lys | His | Glu | Asn | Leu | Gly | Ser | Ala | Leu | Ser | Tyr | Met | 35 | 40 | 45 | |
| Leu | Ala | Asn | Lys | Leu | Ser | Ser | Pro | Ile | Met | Pro | Ala | Ile | Ala | Ile | Arg | 50 | 55 | 60 | |
| Glu | Val | Val | Glu | Glu | Ala | Tyr | Ala | Ala | Asp | Pro | Glu | Met | Ile | Ala | Ser | 65 | 70 | 75 | 80 |
| Ala | Ala | Cys | Asp | Ile | Gln | Ala | Val | Arg | Thr | Arg | Asp | Pro | Ala | Val | Asp | 85 | 90 | 95 | |
| Lys | Tyr | Ser | Thr | Pro | Leu | Leu | Tyr | Leu | Lys | Gly | Phe | His | Ala | Leu | Gln | 100 | 105 | 110 | |
| Ala | Tyr | Arg | Ile | Gly | His | Trp | Leu | Trp | Asn | Gln | Gly | Arg | Arg | Ala | Leu | 115 | 120 | 125 | |
| Ala | Ile | Phe | Leu | Gln | Asn | Gln | Val | Ser | Val | Thr | Phe | Gln | Val | Asp | Ile | 130 | 135 | 140 | |
| His | Pro | Ala | Ala | Lys | Ile | Gly | Arg | Gly | Ile | Met | Leu | Asp | His | Ala | Thr | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Gly | Ile | Val | Val | Gly | Glu | Thr | Ala | Val | Ile | Glu | Asn | Asp | Val | Ser | Ile | 165 | 170 | 175 | |

- 62 -

Leu Gln Ser Val Thr Leu Gly Gly Thr Gly Lys Ser Gly Gly Asp Arg
180 185 190

His Pro Lys Ile Arg Glu Gly Val Met Ile Gly Ala Gly Ala Lys Ile
195 200 205

Leu Gly Asn Ile Glu Val Gly Arg Gly Ala Lys Ile Gly Ala Gly Ser
210 215 220

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Val | Leu | Gln | Pro | Val | Pro | Pro | His | Thr | Thr | Ala | Ala | Gly | Val | Pro |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 |

Ala Arg Ile Val Gly Lys Pro Asp Ser Asp Lys Pro Ser Met Asp Met
245 250 255

Asp Gln His Phe Asn Gly Ile Asn His Thr Phe Glu Tyr Gly Asp Gly
260 265 270

Ile

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 25:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1135 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Doppelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Escherichia coli
(B) STAMM: W3110

- 63 -

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) CLON(E): pPC43

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:

| | |
|--|-----|
| TCCGCGAACT GGC GCATCGC TTCGGCGTTG AAATGCCAAT AACCGAGGAA ATTTATCAAG | 60 |
| TATTATATTG CGGAAAAAAC GCGCGCGAGG CAGCATTGAC TTTACTAGGT CGTGACGCA | 120 |
| AGGACGAGCG CAGCAGCCAC TAACCCAGG GAACCTTTGT TACCGCTATG ACCCGGCCCG | 180 |
| CGCAGAACGG GCCGGTCATT ATCTCATCGT GTGGAGTAAG CAATGTCGTG TGAAGAACTG | 240 |
| GAAATTGTCT GGAACAATAT TAAAGCCGAA GCCAGAACGC TGGCGGACTG TGAGCCAATG | 300 |
| CTGGCCAGTT TTTACCACGC GACGCTACTC AAGCACGAAA ACCTTGGCAG TGCACTGAGC | 360 |
| TACATGCTGG CGAACAAGCT GTCATCGCCA ATTATGCCTG CTATTGCTAT CCGTGAAGTG | 420 |
| GTGGAAGAAG CCTACGCCGC TGACCCGGAA ATGATCGCCT CTGCGGCCTG TGATATTCAG | 480 |
| GCGGTGCGTA CCCGCGACCC GGCAGTCGAT AAATACTCAA CCCCGTTGTT ATACCTGAAG | 540 |
| GGTTTTCATG CCTTGCAGGC CTATCGCATC GGTCCTGGT TGTGGAATCA GGGGCGTCGC | 600 |
| GCACTGGCAA TCTTTCTGCA AAACCAGGTT TCTGTGACGT TCCAGGTCGA TATTCACCCG | 660 |
| GCAGCAAAAA TTGGTCGCGG TATCATGCTT GACCACGCGA CAGGCATCGT CGTTGGTGAA | 720 |
| ACGGCGGTGA TTGAAAACGA CGTATCGATT CTGCAATCTG TGACGCTTGG CGGTACGGGT | 780 |
| AAATCTGGTG GTGACCGTCA CCCGAAAATT CGTGAAGGTG TGATGATTGG CGCGGGCGCG | 840 |


- 64 -

| | |
|---|------|
| AAAATCCTCG GCAATATTGA AGTTGGGCGC GCGCGAAGA TTGGCGCAGG TTCCGTGGTG | 900 |
| CTGCAACCGG TGCCGCCGCA TACCACCGCC GCTGGCGTTC CGGCTCGTAT TGTCGGTAAA | 960 |
| CCAGACAGCG ATAAGCCATC AATGGATATG GACCAGCATT TCAACGGTAT TAACCATACA | 1020 |
| TTTGAGTATG GGGATGGGAT CTAATGTCCT GTGATCGTGC CGGATGCGAT GTAATCATCT | 1080 |
| ATCCGGCCTA CAGTAACTAA TCTCTCAATA CCGCTCCCGG ATACCCCAAC TGTCG | 1135 |

INTERNATIONALES FORMBLATT

Consortium für elektrochem.
Industrie GmbH
Zielstattstr. 20
81379 München

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG
ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

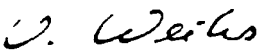
| | |
|--|---|
| I. HINTERLEGER | II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS |
| Name: Consortium für elektrochem. Industrie GmbH Anschrift: Zielstattstr. 20 81379 München | Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeleitete EINGANGSNUMMER: DSM 10173 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung ¹ : 1995-08-18 |
| III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG | |
| Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 1995-08-18 ¹ geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus <input checked="" type="checkbox"/> lebensfähig <input type="checkbox"/> nicht mehr lebensfähig | |
| IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST ² | |
| | |
| V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE | |
| Name: DSM-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig | Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 1995-08-23 |

- ¹ Angabe des Datums der Ershinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.
- ² In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.
- ³ Zutreffendes ankreuzen.
- ⁴ Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

INTERNATIONALES FORMBLATT

Consortium für elektrochem.
Industrie GmbH
Zielstattstr. 20
81379 München

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG.
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

| | |
|--|---|
| I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS | |
| Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: JM3 9 | Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM 10173 |
| II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG | |
| Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde <input checked="" type="checkbox"/> eine wissenschaftliche Beschreibung <input checked="" type="checkbox"/> eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen). | |
| III. EINGANG UND ANNAHME | |
| Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 1995-08-18 (Datum der Ersthinterlegung) ¹ eingegangen ist. | |
| IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG | |
| Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapester Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung). | |
| V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE | |
| Name: DSM-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig | Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 1995-08-23 |

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

I. Freigabeerklärung

- 6 -

Hiermit wird das Hinterlegungsinstitut

Name Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
 Adresse Mascheroder Weg 1b, 3300 Braunschweig

unwiderruflich ermächtigt, Proben des Mikroorganismus

wissenschaftliche Bezeichnung
 E. coli JM39
 Bezeichnung durch den Anmelder
 JM39

der in der deutschen Patentanmeldung P _____ genannt:

- ① ab der ersten Veröffentlichung der Anmeldungsunterlagen (durch Offenlegung oder Patenterteilung) auf Anforderung an jeden Dritten abzugeben.
 Für die mit dem Patenterteilungsverfahren befaßten Behörden und Gerichte gilt die Freigabeerklärung auch schon vor der ersten Veröffentlichung der Anmeldungsunterlagen.
 ② Auf das Recht zur Rückforderung oder Zerstörung der Kultur des Mikroorganismus ab der ersten Veröffentlichung der Anmeldungsunterlagen wird unwiderruflich verzichtet.
 ③ Die Abgabe der Probe soll zu folgenden Bedingungen*) erfolgen:

keine Einschränkung

Ort, Datum

- ④ München, 11.08.95

(Unterschrift des Anmelders)

*) Soweit nicht Bestimmungen des Hinterlegungslandes oder Hinterlegungsinstituts eine Freigabe ohne Bedingungen vorsehen, können die Bedingungen eingefügt werden:

- ⑤ Der Empfänger muß:
 gegenüber der Hinterlegungsstelle Namen und Adresse angeben, die dem Hinterleger von der Hinterlegungsstelle auf Wunsch mitgeteilt;
 eine verpflichtende Erklärung gegenüber dem Hinterleger abgeben, bis zum Ablauf des Patentschutzes
 ⑥ a) die Probe nicht an andere Personen weiterzugeben,
 b) die Probe nicht aus dem Geltungsbereich des Patentsgesetzes zu bringen.

II. Bestätigung

Es wird folgendes bestätigt:

Der oben bezeichnete Mikroorganismus ist in vermehrungsfähigem Zustand

am 18.8.1995 hier hinterlegt worden und hat die Hinterlegungsbezeichnung
 DSM 10173

- ⑦ Die Dauer der Hinterlegung beträgt mindestens 20 Jahre, gerechnet von dem auf den Anmeldetag der obengenannten Patentanmeldung folgenden Tag, d.h. vom _____ 19 _____ zuzüglich einer Nachfrist von 5 . nach Eingang des letzten Antrags auf Abgabe einer Probe bzw. nach Ablauf der gesetzlichen Laufdauer des auf die obengenannte Patentanmeldung erteilten Patent. Vermehrungsfähige Proben dieser Kultur werden während des gesamten Zeitraums unter den oben genannten Voraussetzungen nach Maßgabe der nationalen Bestimmungen über den Verkehr mit den Mikroorganismen an den abgegeben, der die hierfür vorgesehene Gebühr entrichtet. Vor Ablauf der genannten Fristen kann die Hinterlegung durch uns beendet werden, wenn der Mikroorganismus in eine andere Sammlung überführt wird, die die angegebene Aufbewahrungsdauer und den freien Zugang zum Mikroorganismus gewährleistet.
 Für die Ausfuhr der Kultur in die Bundesrepublik Deutschland bestehen derzeit keine Beschränkungen.
 die folgenden Beschränkungen: _____

DSM

DSM-Deutsche Sammlung
von Mikroorganismen und
Zellkulturen

Datum 24.08.1995

Mascheroder Weg
Tel.: 0531 / 261-1

Braunschweig

U. Weis

(Hinterlegungsinstitut)

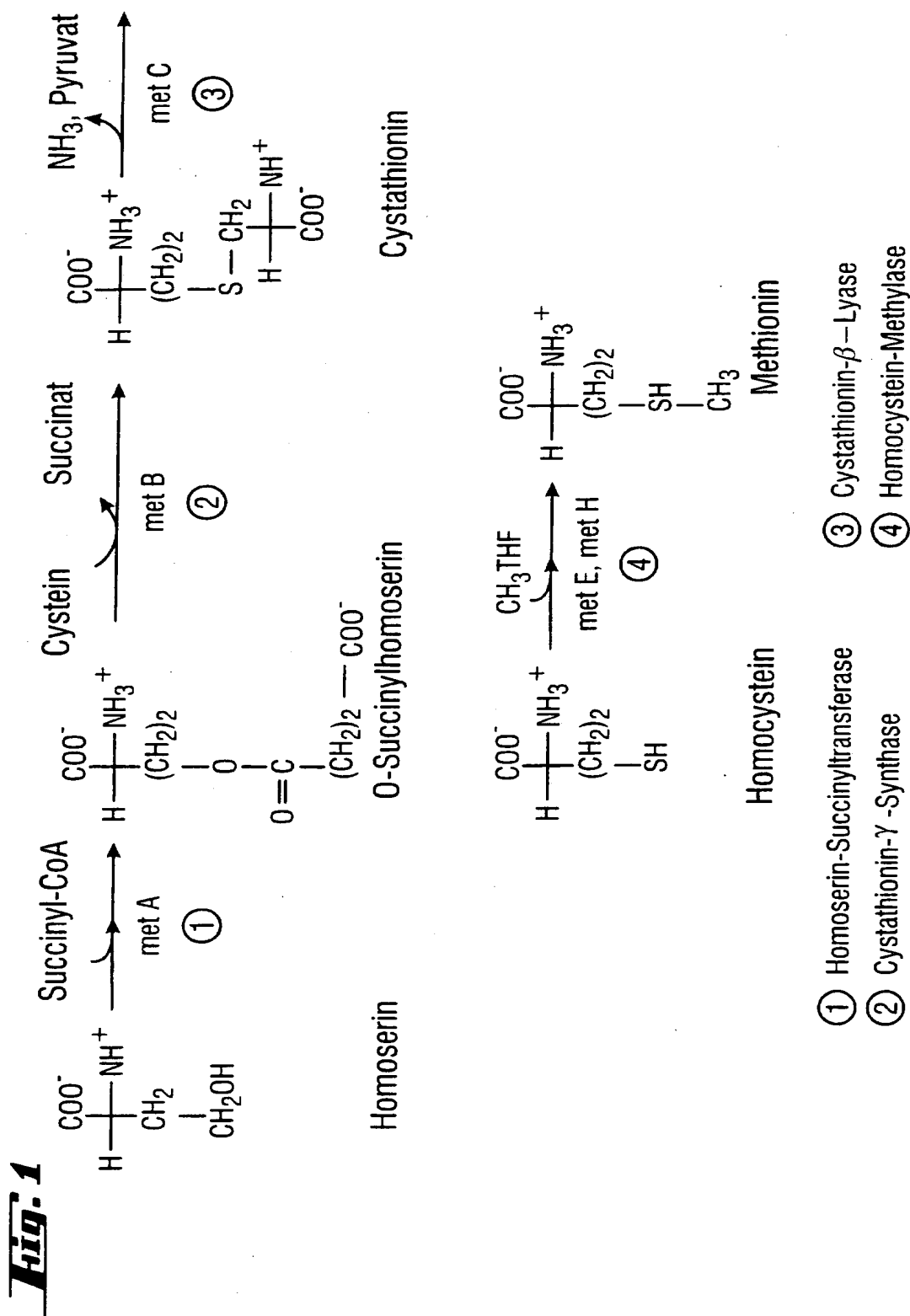
Patentansprüche

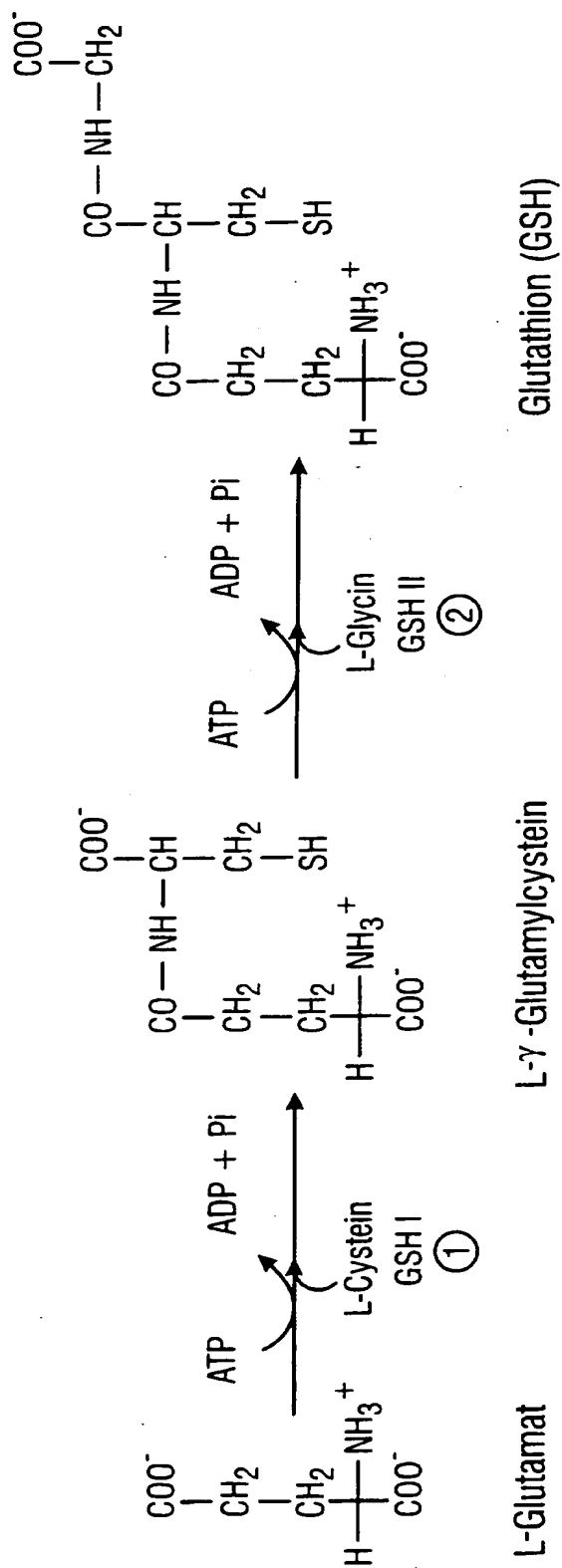
1. Serin-Acetyltransferase, die eine im Vergleich zum Wildtyp-Enzym reduzierte Sensitivität gegenüber dem Inhibitor L-Cystein aufweist und deren Proteinsequenz im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz mindestens eine Mutation oder Deletion aufweist, dadurch gekennzeichnet, daß die Mutation im Sequenzbereich von Aminosäure in Position 97 bis einschließlich der Aminosäure in Position 273 liegt oder die Deletion im carboxyterminalen Sequenzbereich ab der Aminosäure in Position 227 liegt, wobei Position 1 das Startmethionin aus Fig. 5 (SEQ ID NO: 1) ist und wobei die Mutation von Met zu Ile in Position 256 ausgeschlossen ist.
2. Serin-Acetyltransferase gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Inhibitorkonstante K_i von 0,005 bis 2,3 mM in Gegenwart von 1 mM L-Serin und 0,1 mM Acetyl-CoA hat.
3. Serin-Acetyltransferase gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß ihre Proteinsequenz die Aminosäureaustausche mindestens einer der in Tab. 1a oder 1b genannten cySE Mutanten umfaßt.
4. DNS-Sequenz, welche für eine Serin-Acetyltransferase gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 kodiert.
5. DNS-Sequenz, welche für eine Serin-Acetyltransferase kodiert, die eine im Vergleich zum Wildtyp-Enzym reduzierte Sensitivität gegenüber dem Inhibitor L-Cystein aufweist, dadurch gekennzeichnet, daß sie von bp 510 bis bp 1040 mindestens eine Mutation aufweisen, wobei bp 1 die ersten Base aus Fig. 6 (SEQ ID NO: 2) ist, wobei die Mutation von Guanin nach Adenin in

Position 990 ausgeschlossen ist.

6. Mikroorganismen, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen durch zumindest eine DNS-Sequenz gemäß Anspruch 4 oder 5 deregulierten Cysteinstoffwechsel besitzen.
7. Verfahren zur Herstellung von O-Acetylserin, L-Cystein oder von L-Cystein abgeleiteten Produkten, dadurch gekennzeichnet, daß Mikroorganismen gemäß Anspruch 6 in an sich bekannter Weise in einem Nährmedium kultiviert werden.
8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Nährmedium eine ausreichende Menge an Schwefeldonoren enthält.
9. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß als Schwefeldonor Thiosulfat verwendet wird.

1 / 9

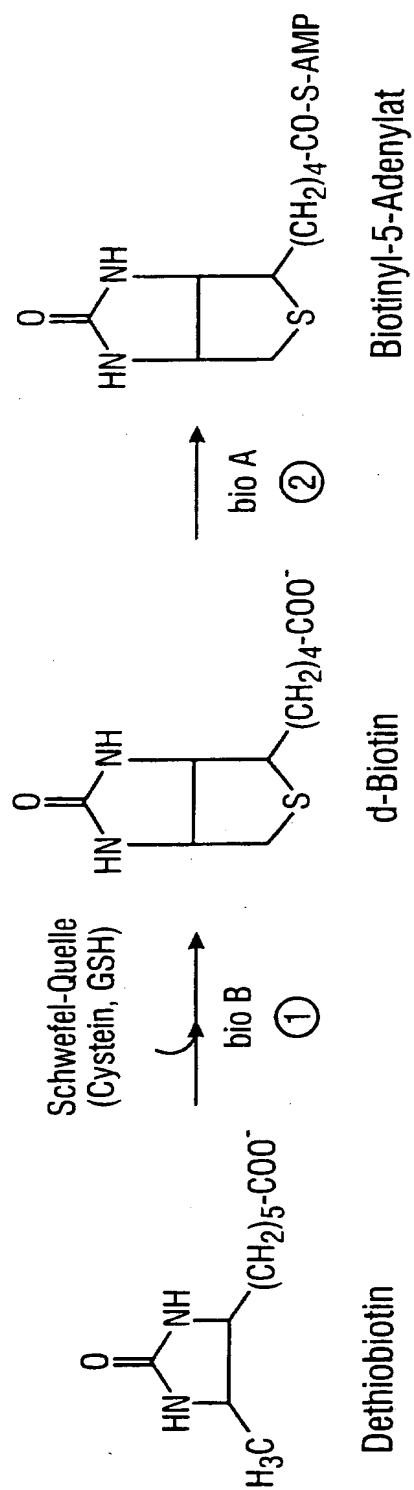




- ① γ -Glutamylcystein-Synthetase
- ② Glutathion-Synthetase

② Glutathion-Synthetase

3 / 9

Fig. 3

① Biotin Synthetase

② Biotin Holoenzym-Synthetase

4 / 9

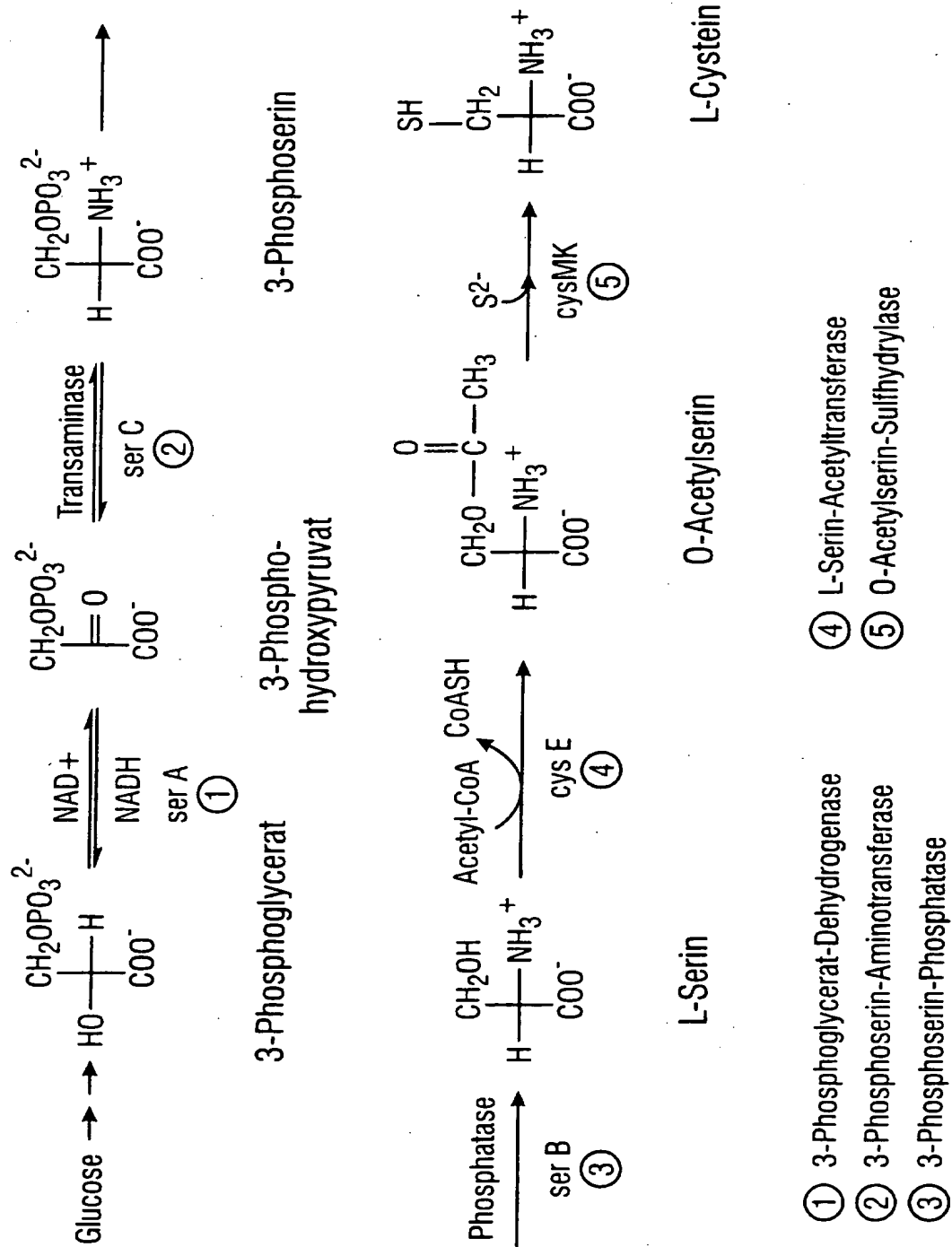
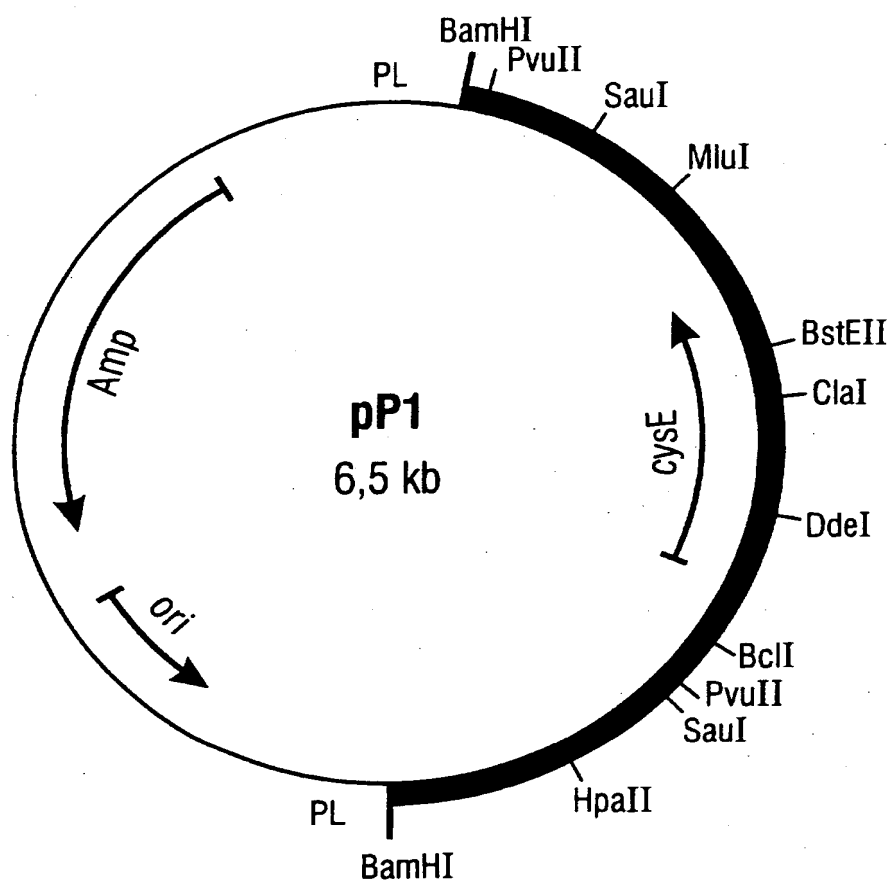
Fig. 4

Fig. 5

1 MSCEELEIVW NNIKAEARTL ADCEPMLASF YHATLLKHEN LGSALSYMLA
51 NKLSSPIMPA IAIREVVVEEA YAADPEMIAS AACDIQAVRT RDPAVDKYST
101 PLLYLKGFHA LQAYRIGHWL WNQGRRALAI FLQNQVSVTF QVDIHPAAKI
151 GRGIMLDHAT GIVVGETAVI ENDVSILQSV TLGGTGKSGG DRHPKIREGV
201 MIGAGAKILG NIEVGRGAKI GAGSVVLQPV PPHTTAAGVP ARIVGKPDSD
251 KPSMDMDQHF NGINHTFEYG DGI

Fig. 6

1 TCCGCGAACTGGCGCATCGCTTCGGCGTTGAAATGCCAATAACCGAGGAAATTTATCAAG
61 TATTATATTGCGGAAAAAACGCGCGCGAGGCAGCATTGACTTTACTAGGTCGTGCACGCA
121 AGGACGAGCGCAGCAGCCACTAACCCCAGGGAACCTTTGTTACCGCTATGACCCGGCCCCG
181 CGCAGAACGGGCCGGTCATTATCTCATCGTGTGGAGTAAGCAATGTCGTGTGAAGAACTG
1 MetSerCysGluGluLeu
241 GAAATTGTCTGGAACAATATTAAAGCCGAAGCCAGAACGCTGGCGGACTGTGAGCCAATG
7 GluIleValTrpAsnAsnIleLysAlaGluAlaArgThrLeuAlaAspCysGluProMet
301 CTGGCCAGTTTTTACCACGCGACGCTACTCAAGCACGAAAACCTTGGCAGTGCCTGAGC
27 LeuAlaSerPheTyrHisAlaThrLeuLeuLysHisGluAsnLeuGlySerAlaLeuSer
361 TACATGCTGGCGAACAAGCTGTTCATCGCCAATTATGCCTGCTATTGCTATCCGTGAAGTG
47 TyrMetLeuAlaAsnLysLeuSerSerProIleMetProAlaIleAlaIleArgGluVal
421 GTGGAAGAAGCCTACGCCGCTGACCCGGAATGATCGCCTCTGCGGCCTGTGATATTCAG
67 ValGluGluAlaTyrAlaAlaAspProGluMetIleAlaSerAlaAlaCysAspIleGln
481 GCGGTGCGTACCCGCGACCCGGCAGTCGATAAATACTCAACCCCGTTGTTATACCTGAAG
87 AlaValArgThrArgAspProAlaValAspLysTyrSerThrProLeuLeuTyrLeuLys
541 GGTTCATGCCTTGCAGGCCTATCGCATCGGTCACTGGTTGTGGAATCAGGGGCGTCGC
107 GlyPheHisAlaLeuGlnAlaTyrArgIleGlyHisTrpLeuTrpAsnGlnGlyArgArg
601 GCACTGGCAATCTTTCTGCAAAACCAGTTTTCTGTGACGTTCCAGGTCGATATTCACCCG
127 AlaLeuAlaIlePheLeuGlnAsnGlnValSerValThrPheGlnValAspIleHisPro
661 GCAGCAAAAATTGGTCGCGGTATCATGCTTGACCACGCGACAGGCATCGTCGTTGGTGAA
147 AlaAlaLysIleGlyArgGlyIleMetLeuAspHisAlaThrGlyIleValValGlyGlu
721 ACGGCGGTGATTGAAAACGACGTATCGATTCTGCAATCTGTGACGCTTGGCGGTACGGGT
167 ThrAlaValIleGluAsnAspValSerIleLeuGlnSerValThrLeuGlyGlyThrGly
781 AAATCTGGTGGTGACCGTCACCCGAAAATTTCGTGAAGGTGTGATGATTGGCGCGGGCGCG
187 LysSerGlyGlyAspArgHisProLysIleArgGluGlyValMetIleGlyAlaGlyAla
841 AAAATCCTCGGCAATATTGAAGTTGGGCGCGGCGGAAGATTGGCGCAGGTTCCGTGGTG
207 LysIleLeuGlyAsnIleGluValGlyArgGlyAlaLysIleGlyAlaGlySerValVal
901 CTGCAACCGGTGCCGCCGCATACCACCGCCGCTGGCGTTCGGGCTCGTATTGTCGGTAA
227 LeuGlnProValProProHisThrThrAlaAlaGlyValProAlaArgIleValGlyLys
961 CCAGACAGCGATAAGCCATCAATGGATATGGACCAGCATTTCACGGTATTAACCATACA
247 ProAspSerAspLysProSerMetAspMetAspGlnHisPheAsnGlyIleAsnHisThr
1021 TTTGAGTATGGGGATGGGATCTAATGTCCTGTGATCGTGCCGGATGCGATGTAATCATCT
267 PheGluTyrGlyAspGlyIleEnd
1081 ATCCGGCCTACAGTAACTAATCTCTCAATACCGCTCCCGGATACCCCAACTGTGCG-1135

Fig. 1

Restriktionskarte des Plasmids pP1

—— pUC18; ——— chromosomale DNA; PL: Polylinker

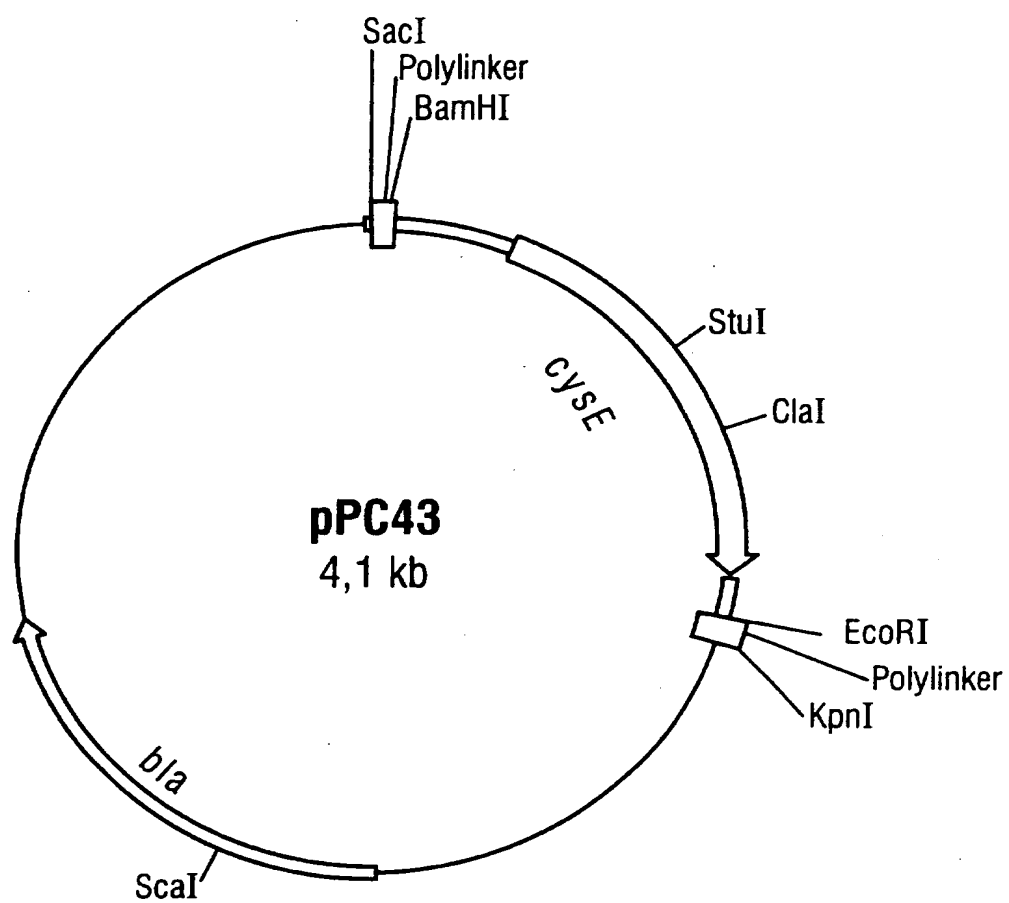
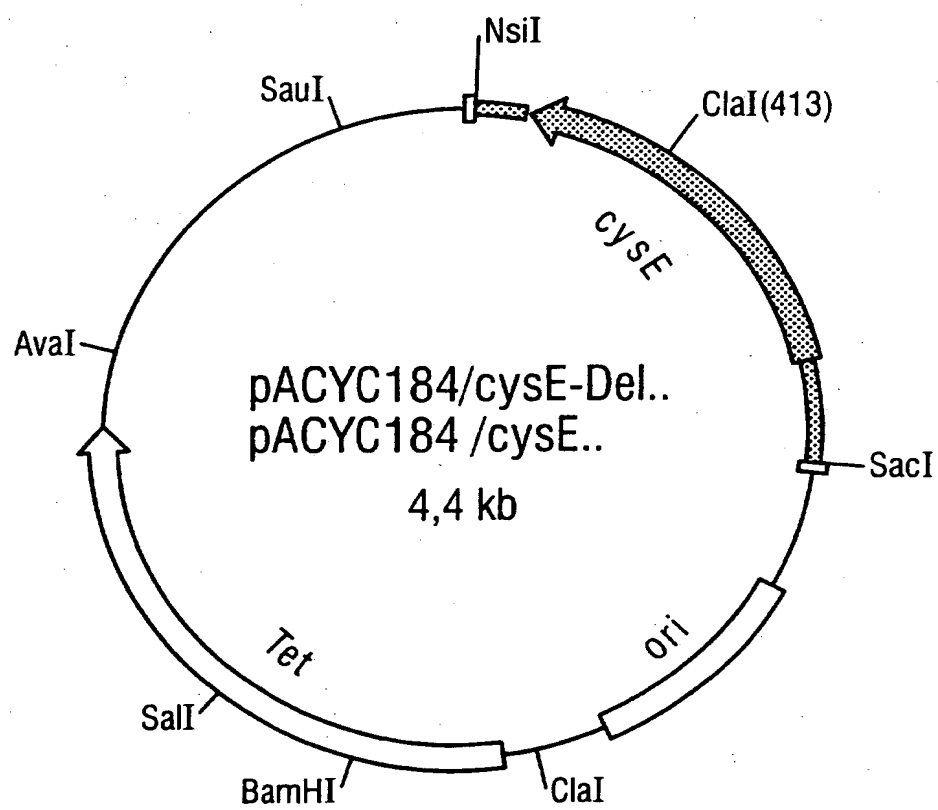
Fig. 8

Fig. 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inventor's Application No
PCT/EP 96/04613

| | | |
|--|---|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/54 C12N9/10 C12N1/21 C12P13/12 | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N C12P | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | THE JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, vol. 133, no. 3, March 1987, pages 515-525, XP0000617605 DAGMAR DENK ET AL.: "L-Cysteine biosynthesis in Escherichia coli: Nucleotide sequence and expression of the Serine Acetyltransferase (cysE) gene from the wild-type and a Cysteine -excreting mutant" cited in the application | 1-6 |
| Y | see abstract see page 517, paragraph 6 see page 518, paragraph 1 - page 519, paragraph 1; figure 2 see page 521, paragraph 2 - page 525, paragraph 1 <div style="text-align: center;">---</div> <div style="text-align: center;">-/--</div> | 7-9 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. | | |
| * Special categories of cited documents : <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div> | | |
| Date of the actual completion of the international search <div style="text-align: center;">27 February 1997</div> | | Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center;">14.03.97</div> |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016 | | Authorized officer <div style="text-align: center;">Montero Lopez, B</div> |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 96/04613

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| Y | <p>THE JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, vol. 133, no. 10, October 1987, pages 2719-2725, XP000618706 AGNIESZKA E. SIRKO ET AL.: "Identification of the Escherichia coli cysM gene encoding O-Acetylserine sulphydrylase B by cloning with Mini-Mu-lac containing a plasmid replicon" cited in the application see page 2719, last paragraph see page 2720, last paragraph - page 2721, paragraph 1 see page 2724, paragraph 2 -----</p> | 7-9 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/04613

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/54 C12N9/10 C12N1/21 C12P13/12

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| X | THE JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, Bd. 133, Nr. 3, März 1987, Seiten 515-525, XP000617605 DAGMAR DENK ET AL.: "L-Cysteine biosynthesis in Escherichia coli: Nucleotide sequence and expression of the Serine Acetyltransferase (cysE) gene from the wild-type and a Cysteine -excreting mutant" in der Anmeldung erwähnt | 1-6 |
| Y | siehe Zusammenfassung siehe Seite 517, Absatz 6 siehe Seite 518, Absatz 1 - Seite 519, Absatz 1; Abbildung 2 siehe Seite 521, Absatz 2 - Seite 525, Absatz 1 --- -/- | 7-9 |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☐ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

27. Februar 1997

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

14.03.97

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Montero Lopez, B

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 96/04613

| C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
|--|---|--------------------|
| Kategorie | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| Y | <p>THE JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, Bd. 133, Nr. 10, Oktober 1987, Seiten 2719-2725, XP000618706 AGNIESZKA E. SIRKO ET AL.: "Identification of the Escherichia coli cysM gene encoding O-Acetylserine sulphydrylase B by cloning with Mini-Mu-lac containing a plasmid replicon" in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 2719, letzter Absatz siehe Seite 2720, letzter Absatz - Seite 2721, Absatz 1 siehe Seite 2724, Absatz 2 -----</p> | 7-9 |